

# **Oberflächenspezifische Adsorption von Peptiden zur Funktionalisierung gedruckter Muster**

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Chem. Steffi Große

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:    1. Prof. Dr. Hans G. Börner  
                  2. Prof. Stefan Hecht, Ph. D.  
                  3. Prof. Dr. Michael G. Weller

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2017

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Prof. Dr. Hans G. Börner in der Zeit von November 2012 bis Oktober 2016 am Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin.

*„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:  
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,  
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,  
wieder wegzuwerfen.“*

- Albert Einstein -

<b>1</b>	<b>MOTIVATION .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>STAND DER FORSCHUNG .....</b>	<b>3</b>
2.1	BESSER, SCHNELLER, KLEINER UND GÜNSTIGER – DIE ENTWICKLUNG NEUER FUNKTIONALER MATERIALIEN .....	3
2.2	MÖGLICHKEITEN DER OBERFLÄCHENFUNKTIONALISIERUNG .....	5
2.2.1	Physisorption und Chemisorption .....	6
2.2.2	Homogene Oberflächenfunktionalisierungen .....	7
2.2.3	Strukturierte Oberflächenfunktionalisierungen .....	9
2.2.3.1	Lithographische und direkte Schreibmethoden .....	10
2.2.3.2	Der Einsatz von Druckern .....	13
2.2.4	Funktionalisierung mittels spezifisch bindender Peptide .....	15
2.3	SELEKTION SPEZIFISCH BINDENDER PEPTIDE .....	17
2.3.1	Rationales Design und kombinatorische Möglichkeiten .....	17
2.3.2	Phagen-Display .....	18
2.4	DAS VERWENDETE SYSTEM: BEDRUCKTES PAPIER .....	21
2.4.1	Zusammensetzung und Aufbau von Cellulose und Papier .....	22
2.4.2	Funktionalisierung von Cellulose .....	24
2.4.3	Funktionalisierung von Papier .....	28
2.4.4	Zusammensetzung und Aufbau von Toner .....	29
2.4.5	Funktionalisierung von Tinten und Toner .....	30
<b>3</b>	<b>ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>34</b>
4.1	ANALYSE DER OBERFLÄCHEN .....	34
4.1.1	Papier und Cellulose .....	34
4.1.2	Toner .....	37
4.2	PHAGEN-DISPLAY .....	42
4.2.1	Durchführung und Optimierung des Screenings .....	42



4.2.2	Auswertung erhaltener Sequenzen .....	46
4.2.2.1	Cellulose .....	46
4.2.2.2	Toner.....	49
4.3	ERSTE ADSORPTIONSUNTERSUCHUNGEN AN ISOLIERTEN SUBSTRATEN .....	52
4.3.1	Untersuchungen zur Spezifität der Peptide.....	53
4.3.1.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen .....	53
4.3.1.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen .....	58
4.3.2	Raman-Spektroskopie.....	60
4.4	ADSORPTIONSUNTERSUCHUNGEN AN GEDRUCKTEN MUSTERN.....	62
4.4.1	Optimierung der Inkubationsbedingungen durch bildgebende MALDI-TOF-MS-Messungen.....	62
4.4.2	Fluoreszenzmikroskopie .....	66
4.4.3	PICUP-Strategie zur Stabilisierung der Tonerbeschichtung .....	68
4.5	ERWEITERTE ADSORPTIONSUNTERSUCHUNGEN .....	72
4.5.1	Peptid-Polymer-Konjugate .....	72
4.5.2	Sequenzabhängigkeit der Adsorption zu den Substraten.....	75
4.5.3	Modell-Konjugate.....	79
4.5.4	Bindungskinetiken an den Substraten.....	80
4.5.5	Bindungsstudien mittels Langmuir-Isothermen .....	81
4.5.6	Verstärkung der Adsorption .....	83
4.6	FUNKTIONALISIERUNG BESCHICHTETER, GEDRUCKTER MUSTER .....	84
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>91</b>
6.1	MATERIALIEN .....	91
6.1.1	Chemikalien.....	91
6.1.2	Phagen-Display.....	93
6.2	LÖSUNGEN UND PUFFER.....	94

6.3	MESSGERÄTE .....	95
6.4	PHAGEN-DISPLAY .....	98
6.5	METHODEN UND ERGEBNISSE .....	108
6.6	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG DER EINGESETZTEN VERBINDUNGEN .....	116
6.6.1	Poly(styrol- <i>co</i> -butylacrylat) Extraktion.....	116
6.6.2	Poly(styrol- <i>co</i> -butylacrylat) Synthese .....	116
6.6.3	CBP1 (GGGMHPNAGHGSLMR) .....	117
6.6.4	<sup>FAM</sup> CBP1 ( <sup>FAM</sup> GGGMHPNAGHGSLMR) .....	118
6.6.5	<sup>FAM</sup> CBP1 <sub>MIX</sub> ( <sup>FAM</sup> GGGGPMSRHNMLHAG) .....	119
6.6.6	<sup>FAM</sup> CBP1-PEO <sub>70</sub> ( <sup>FAM</sup> GGGMHPNAGHGSLMR-PEO <sub>70</sub> ) .....	120
6.6.7	<sup>FAM</sup> CBP1-PEO <sub>120</sub> ( <sup>FAM</sup> GGGMHPNAGHGSLMR-PEO <sub>120</sub> ).....	121
6.6.8	<sup>FAM</sup> CBP2 ( <sup>FAM</sup> GGGTPQSFQKGSV) .....	123
6.6.9	<sup>FAM</sup> CBP3 ( <sup>FAM</sup> GGGGDGNVLPKGNW) .....	124
6.6.10	TBP1 (GGGSGVYKVAYDWQH).....	125
6.6.11	<sup>FAM</sup> TBP1 ( <sup>FAM</sup> GGGSGVYKVAYDWQH) .....	126
6.6.12	<sup>FAM</sup> TBP1 <sub>MIX</sub> ( <sup>FAM</sup> GGGDVSYQAHYWVGK) .....	127
6.6.13	<sup>FAM</sup> TBP1-PEO <sub>70</sub> ( <sup>FAM</sup> GGGSGVYKVAYDWQH-PEO <sub>70</sub> ).....	128
6.6.14	<sup>FAM</sup> TBP1 PEO <sub>120</sub> ( <sup>FAM</sup> GGGSGVYKVAYDWQH-PEO <sub>120</sub> ) .....	130
6.6.15	<sup>FAM</sup> TBP1 <sub>2</sub> -PEO <sub>70</sub> (( <sup>FAM</sup> GGGSGVYKVAYDWQHGGG) <sub>2</sub> K-PEO <sub>70</sub> ).....	131
6.6.16	<sup>RhoB</sup> TBP1 ( <sup>RhoB</sup> GGGSGVYKVAYDWQH).....	132
6.6.17	<sup>FAM</sup> TBP2 ( <sup>FAM</sup> GGGLPVNGDAELWHS) .....	133
6.6.18	<sup>FAM</sup> TBP3 ( <sup>FAM</sup> GGGGLHTSATNLYLH).....	134
6.6.19	<sup>FAM</sup> R <sub>12</sub> -PEO <sub>70</sub> ( <sup>FAM</sup> GRRRRRRRRRRRRR-PEO <sub>70</sub> ) .....	135
6.6.20	<sup>FAM</sup> F <sub>6</sub> -PEO <sub>70</sub> ( <sup>FAM</sup> GGGFFFFFFF-PEO <sub>70</sub> ).....	136
6.6.21	<sup>RhoB</sup> GGG <sup>COOH</sup> .....	138
6.6.22	<sup>RhoB</sup> GGG-PTAD.....	139
6.6.23	<sup>RhoB</sup> GGG-PTAD* .....	140

6.6.24	$\text{RhoB}^{\text{GG(DDRK)}_2\text{GGG-PTAD}}$ .....	140
6.6.25	$\text{RhoB}^{\text{GG(DDRK)}_2\text{GGG-PTAD}^*}$ .....	141
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>142</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>153</b>
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	153
8.2	LEBENS LAUF.....	155
8.3	PUBLIKATIONS LISTE .....	156
8.4	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	157

## 1 MOTIVATION

In der heutigen, hochentwickelten, modernen Welt werden funktionale Materialien häufig aus sehr komplexen und spezialisierten Werkstoffen hergestellt. Meist steht jahrelange Forschung am Anfang neuer Errungenschaften, die uns das alltägliche Leben vereinfachen und ihren Ursprung im Labor fanden. Die Rohstoffe für diese neuen Produkte sind häufig nicht regenerativ wie Erdöl, Minerale oder Erze. Probleme der Nachhaltigkeit solcher Rohstoffe und auch ein ökologisches Umdenken zwingen Industrie und Forschung zunehmend dazu, sich nach neuen oder auch alten, zusehends in Vergessenheit geratenen Alternativen umzusehen. Die Herstellung funktionaler Materialien aus nachhaltigen Rohstoffen mit einfachen Mitteln auf möglichst kostensparende Weise findet dementsprechend zunehmend Eingang in das wissenschaftliche Denken.

Cellulose z. B. ist ein ubiquitärer natürlicher Rohstoff und bietet eine Vielfalt an positiven Eigenschaften als Ausgangsmaterial für die unterschiedlichsten Anwendungen. Als Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände ist sie ein regenerativer, nachhaltiger und günstiger Rohstoff mit viel Potential. Auch ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften machen Cellulose zu einem vielversprechenden Kandidaten für verschiedene Anforderungen: sie ist mechanisch und thermisch relativ stabil, farb- und geruchlos, hydrophil, biokompatibel, bioabbaubar und zusätzlich chemisch vielfältig funktionalisierbar. Daher ist das Interesse an cellulosebasierten funktionalen Materialien in den letzten Jahrzehnten stetig gewachsen.

Papier ist wohl das meist verbreitete, cellulosebasierte Material, das sowohl im Haushalt als auch in Industrie und Forschung in unzähligen Varianten genutzt wird. Viele Wissenschaftler arbeiten an der Entwicklung kostengünstiger, papierbasierter Systeme, die uns den Alltag und auch die Forschung erleichtern sollen. Dafür ist es häufig notwendig, unterschiedliche Bereiche des Papiers mit unterschiedlichen Eigenschaften zu funktionalisieren. Die Strukturierung solcher Modifikationen auf der Paperoberfläche stellt eine gewisse Herausforderung dar und setzt häufig komplexe Geräte oder mehrere aufeinander folgende, zeitaufwendige Arbeitsschritte voraus. Um solche Funktionalisierungen besser zugänglich zu machen, ist es sinnvoll einfache und kommerzielle Geräte wie bspw. handelsübliche Drucker zu nutzen. Kommerzielle Laserdrucker sind z. B. in der Lage, feine Muster oder auch größere Flächen aus Toner innerhalb weniger Sekunden auf unterschiedlichen Materialien zu drucken.

Könnten nun die verschiedenen Oberflächen von Papier und Toner einzeln adressiert werden, um sie unterschiedlich zu funktionalisieren, bildete dies ein relativ einfaches System mit einem breiten Anwendungsspektrum. In den letzten Jahrzehnten haben sich z. B. Peptide aufgrund ihrer

strukturellen und funktionalen Diversität als sehr spezifische Oberflächenbinder bewiesen. Sie werden nicht nur in der biologischen und medizinischen Forschung zur Funktionalisierung genutzt, sondern finden zunehmend auch Einzug in die Materialwissenschaften.

Zur Selektion solcher oberflächenbindenden Peptide bieten sich verschiedene Methoden an wie das rationale Design oder der Einsatz kombinatorischer Bibliotheken. Am häufigsten werden hierfür Peptidbibliotheken oder rekombinante Bibliotheken wie sie das Phagen-Display nutzt eingesetzt. Dabei werden in einem Screening-Prozess die besten Bindungssequenzen für die entsprechende Substratoberfläche ermittelt.

Auf diese Weise sollen im Verlauf der vorliegenden Arbeit kurze Peptide selektiert werden, die in der Lage sind, kreuzspezifisch an der Oberfläche von Cellulose, dem Hauptbestandteil von Papier, oder an der Toner Oberfläche zu binden. Die Anbindung funktionaler Gruppen an eines dieser Peptide kann schließlich unterschiedliche Funktionalisierungen beider Oberflächen ermöglichen. Damit wird ein neuer und leicht zugänglicher Weg zur Funktionalisierung gedruckter Muster vorgestellt, der ein breites Spektrum zur Herstellung funktionaler Materialien eröffnet. Dadurch kann möglicherweise ein Grundstein für neue Wege zur Entwicklung kostengünstiger Sensoren für Medizin und Industrie gelegt werden.

## 2 STAND DER FORSCHUNG

### 2.1 Besser, schneller, kleiner und günstiger – die Entwicklung neuer funktionaler Materialien

Die Entwicklung kostengünstiger funktionaler Materialien steht immer häufiger im Vordergrund der Forschung, um neue Errungenschaften einer breiten Öffentlichkeit zugänglich zu machen. Die allermeisten Ansätze zur Herstellung solcher neuen, funktionalen Materialien nutzen einen weit verbreiteten Rohstoff als Plattform wie bspw. Papier, Glas oder Polymere und beschränken sich darauf, lediglich dessen Oberfläche oder bestimmte Bereich mit den gewünschten Funktionalitäten zu beschichten. Dies spart Materialkosten und bietet außerdem die Möglichkeit, sowohl Volumen- als auch Oberflächeneigenschaften separat und maßgeschneidert der jeweiligen Anwendung anzupassen.

Besonders hervorgehoben werden dabei häufig die Vorteile in Bereichen wie der medizinischen Diagnostik, da dort in entscheidenden Situationen häufig kein Zugang zu gut ausgestatteten Laboren mit dem notwendigen Equipment gegeben ist. Deshalb sollten solche diagnostischen Materialien möglichst leicht zu handhaben sein, ohne bestimmte Reagenzien, Geräte oder eine entsprechend langjährige Ausbildung vorauszusetzen.<sup>[1]</sup> Bekannte Beispiele hierfür sind Teststreifen, die Rückstände bestimmter Drogen im Urin anzeigen, oder auch Schwangerschaftstest für den Hausgebrauch. Solche immunochromatographischen Schnelltests beruhen meist auf der Reaktion bestimmter Antikörper mit den entsprechenden Antigenen in der Probe. Weit verbreitet sind auch Glucose-Messgeräte, die den Blutzuckerwert schnell und unkompliziert bestimmen können. Y. LU und Y. XIANG haben in einem vielversprechenden Ansatz solche Geräte zusätzlich genutzt, um nicht-Glucose Substrate wie Adenosin, Kokain oder einen Tuberkulose Marker zu detektieren. Das Prinzip beruht dabei auf einer Substrat-induzierten Freisetzung von Invertase aus einem funktionalen DNA-Invertase-Konjugat. Die freigesetzte Invertase kann anschließend Saccharose zu Glucose umsetzen, deren Konzentration mit einem kommerziellen Messgerät analysiert werden kann.<sup>[2]</sup>

Ein großes Themengebiet bei der Herstellung solcher diagnostischer Materialien und Geräte stellt die Mikrofluidik dar. Diese beschäftigt sich mit dem Verhalten von geringen Mengen an Flüssigkeiten und Gasen ( $10^{-3}$  -  $10^{-12}$  Liter) auf kleinstem Raum, wobei vor allem Kapillar- und Reibungskräfte eine große Rolle spielen. Dadurch können z. B. mikrofluide, papierbasierte, analytische Systeme, oder kurz  $\mu$ PADs (*microfluidic paper analytical devices*) entstehen.<sup>[3, 4]</sup> Einige Beispiele hierfür werden in Kapitel 2.4.3 ausführlich vorgestellt. Systeme, die ohne

Cellulose auskommen, nutzen stattdessen Glas oder Polymere als Plattform. So können mikrofluide Systeme aus Glas bspw. durch einfaches Ätzen der gewünschten Muster in eine Glasoberfläche und anschließende Verklebung mit einer unbehandelten Glasschicht mit kommerziellen Mitteln hergestellt werden.<sup>[5]</sup>

Ein ganz anderes Gebiet, in dem flexible, kostengünstige und funktionale Materialien zunehmendes Interesse wecken, sind Solarzellen. Polymerbasierte organische Solarzellen haben großes Potential und werden als kostengünstige Alternative zu anorganischen Silizium-basierten Solarzellen untersucht. Ihre Herstellung über günstige Rolle-zu-Rolle-Verfahren (engl. *roll-to-roll*, R2R) bietet kosten- und zeitsparende Möglichkeiten.<sup>[6]</sup>

Ein weiteres Gebiet, in dem die Herstellung kostengünstiger Materialien mit möglichst einfachen Mitteln zunehmend vorangetrieben wird, ist die Elektronik. Gedruckte oder biegsame elektronische Bauteile stehen dabei häufig im Vordergrund.<sup>[7-9]</sup> Auch hier werden bekannte anorganische Rohstoffe zunehmend durch flexiblere organische Materialien ersetzt, die zukünftig mittels günstiger und großtechnisch einsetzbarer Rolle-zu-Rolle-Verfahren produziert werden sollen.<sup>[9-11]</sup> Mittels Tintenstrahldruck können bspw. digitale Schaltkreise auf flexible Polymersubstrate aufgetragen werden.<sup>[8]</sup> J. LIU *et al.* stellten kürzlich eine günstige, flüssige Metall-basierte Tinte für direkte Schreibmethoden vor, die elektrisch leitend und biokompatibel ist und eine gut kontrollierbare Benetzbarkeit aufweist.<sup>[12, 13]</sup>

Schließlich bietet die Kombination gedruckter elektronischer Sensoren mit papierbasierter Mikrofluidik zusätzliche, vielversprechende Möglichkeiten zur Herstellung diagnostischer Materialien. G. JENKINS, X. YANG *et al.* arbeiten z. B. daran unterschiedliche Komponenten wie hydrophobe Barrieren und Elektroden gemeinsam mittels Tintenstrahldruck in einem einzigen funktionalen System zu strukturieren.<sup>[14]</sup>

Diese Beispiele zeigen, wie bedeutend die selektive Funktionalisierung von Oberflächen bei der Herstellung solcher funktionaler Materialien ist. Entsprechend fokussiert sich diese Arbeit darauf, die bekannten Methoden dafür um neue Ansätze zu erweitern. Für ein grundlegendes Verständnis werden im folgenden Abschnitt bekannte Möglichkeiten der Oberflächenfunktionalisierung vorgestellt. Außerdem werden die physikalischen und chemischen Grundlagen erläutert und daraus resultierende Anwendungsmöglichkeiten zur homogenen oder auch strukturierten Funktionalisierung verschiedener Oberflächen vorgestellt. Schließlich werden spezifisch bindende Peptide als Möglichkeit der Substratbeschichtung näher betrachtet.

## 2.2 Möglichkeiten der Oberflächenfunktionalisierung

„Das Volumen des Festkörpers schuf Gott, ihre Oberfläche wurde vom Teufel gemacht“.<sup>[15]</sup> Dieses überlieferte Zitat des 1900 geborenen Wissenschaftlers W. PAULI lässt erahnen, dass die Fragestellungen, die sich mit der Erforschung von Oberflächen befassen, sehr umfangreich und kompliziert sein können. Die Oberflächenwissenschaft wurde definiert als das Studium physikalischer und chemischer Phänomene, die an der Grenzfläche zweier Phasen, sei es fest-flüssig, fest-gasförmig, fest-Vakuum oder auch flüssig-gasförmig, auftreten.<sup>[16]</sup> Diese Grenzflächen zwischen zwei Materialien bestimmen im hohen Maße wie diese miteinander wechselwirken. Die Topologie und die chemischen Funktionen an der Oberfläche sind entscheidend für die Eigenschaften des gesamten Stoffes. Daher wird sowohl in der Forschung als auch in der Industrie sehr häufig eine homogene Oberfläche angestrebt. Im Idealfall lassen sich die Eigenschaften eines Materials über die Oberflächenchemie steuern und können maßgeschneidert auf die gewünschte Anwendung angepasst werden. Über die Oberflächenchemie lassen sich physikalische, elektronische, katalytische, optische, Korrosions- und auch Adhäsionseigenschaften steuern.

In der Biomedizin bspw. sollen Implantatoberflächen je nach Anwendung entweder vor dem unerwünschten biologischen Abbau des Implantats schützen oder aber eine Plattform für das Wachstum neuer Zellen darstellen.<sup>[17]</sup> Wird eine Oberfläche mit bestimmten Molekülen oder chemischen Gruppen funktionalisiert, können daraus unterschiedliche Anwendungen wie Sensoren, elektrische Leiter oder auch ein Substrat für weiterführende Funktionalisierungsmöglichkeiten resultieren. Ein weit verbreitetes Beispiel in der angewandten Forschung für Biosensoren ist das *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).<sup>[18, 19]</sup> Durch die Funktionalisierung einer Polymeroberfläche (in der Praxis meist eine Titerplatte) mit Antikörpern können mittels ELISA verschiedene Biomoleküle wie Proteine, Hormone oder Pestizide teilweise sogar gleichzeitig nachgewiesen werden.<sup>[19]</sup> Beispiele aus dem Bereich der Technik sind Oberflächen von Halbleitern wie Silizium. Diese werden mit organischen Molekülen funktionalisiert, um bspw. passiviert und geschützt zu werden oder um molekulare Erkennungssysteme zu realisieren.<sup>[20, 21]</sup> In der Mikroelektronik besteht die Herausforderung häufig darin, immer kleinere Oberflächen zu funktionalisieren. Ebenso bieten sich im Bereich der Nanopartikel zahlreiche Möglichkeiten, deren Eigenschaften durch die Funktionalisierung ihrer Oberfläche zu optimieren. Die Funktionalisierung anorganischer Nanopartikel mit organischen Molekülen kann bspw. deren unerwünschte Agglomeration in unterschiedlichsten Medien verhindern oder auch Biokompatibilität für pharmazeutische Anwendungen ermöglichen.<sup>[22-24]</sup>



Umgekehrt kann die Funktionalisierung organischer Oberflächen wie Cellulose mit Metall-(Nano)Partikeln deren elektronische Eigenschaften verändern.<sup>[25]</sup>

### 2.2.1 Physisorption und Chemisorption

Es gibt zwei grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen, sowohl anorganische als auch organische Oberflächen zu funktionalisieren. Einerseits können chemische Funktionen kovalent über neu entstehende chemische Bindungen an der Oberfläche fixiert werden. In diesem Fall wird die Funktionalisierung als Chemisorption bezeichnet.<sup>[26]</sup> Dafür muss die entsprechende Oberfläche bei Abwesenheit reaktiver funktionaler Gruppen im Voraus aktiviert werden. Das heißt, es sind hohe Aktivierungsenergien zu überwinden, bspw. durch chemische Reaktionen, UV- oder Gammabestrahlung, Plasmabehandlung oder ähnliches.<sup>[15]</sup>

Es können aber auch schwächere intermolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder Van-der-Waals-Kräfte zur Funktionalisierung der Oberfläche genutzt werden. Dies wird als Physisorption bezeichnet.<sup>[26]</sup> Im Gegensatz zur Chemisorption wird bei der Physisorption die chemische Struktur von Oberfläche und adsorbierten Teilchen (Adsorbat) nicht verändert und es liegt ein Gleichgewicht von Adsorption und Desorption vor. Weiterhin ist die Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen aufgrund ihrer deutlich schwächeren Adsorptionsenthalpien von 0,5 kJ/mol bis zu 50 kJ/mol meist reversibel. Tabelle 2.1 zeigt eine vergleichende Gegenüberstellung der Hauptmerkmale von Physisorption und Chemisorption.

**Tabelle 2.1.** Vergleichende Gegenüberstellung von Physisorption und Chemisorption.

Physisorption	Chemisorption
intermolekulare Wechselwirkungen	kovalente Bindung
geringe Aktivierungsenergien	hohe Aktivierungsenergien
geringe Adsorptionsenthalpien (0,5 – 50 kJ/mol)	hohe Adsorptionsenthalpien (50 – 500 kJ/mol)
reversibel	irreversibel
Multischichten möglich	Monoschichten

Kovalente Funktionalisierungen haben den allgemeinen Vorteil, dass sie deutlich stabiler und häufig auch präziser kontrollierbar sind. Ein Nachteil liegt dagegen in den teilweise sehr hohen

benötigten Aktivierungsenergien.<sup>[15]</sup> Einige organische Substrate, die nicht über entsprechende funktionalisierbare, aktive Gruppen verfügen, können z. B. bei der Aktivierung durch energiereiche Bestrahlung zerstört werden. Weiterhin kann die chemische Funktionalisierung neben den gewünschten auch ungewollte Änderungen bestimmter Eigenschaften bewirken. So können bspw. die hervorragende mechanische Festigkeit und Leitfähigkeit von Kohlenstoffnanooberflächen durch kovalente Funktionalisierungen verloren gehen, da das sonst gleichmäßige Netzwerk sp<sup>2</sup>-hybridisierter Kohlenstoffe unterbrochen wird.<sup>[27]</sup>

Nicht-kovalente Funktionalisierungen sind zwar deutlich schwächer als kovalente, besitzen aber andere Vorteile wie ihre Reversibilität mittels Änderungen von pH-Wert, Lösungsmittel oder der Temperatur. Dies kann gezielt bspw. zur Aufreinigung bestimmter Stoffe eingesetzt werden.<sup>[28, 29]</sup> Die Wahl des Funktionalisierungsweges sollte daher immer entsprechend abgewägt werden, je nachdem, welche Eigenschaften für das funktionalisierte Material entscheidend sind.

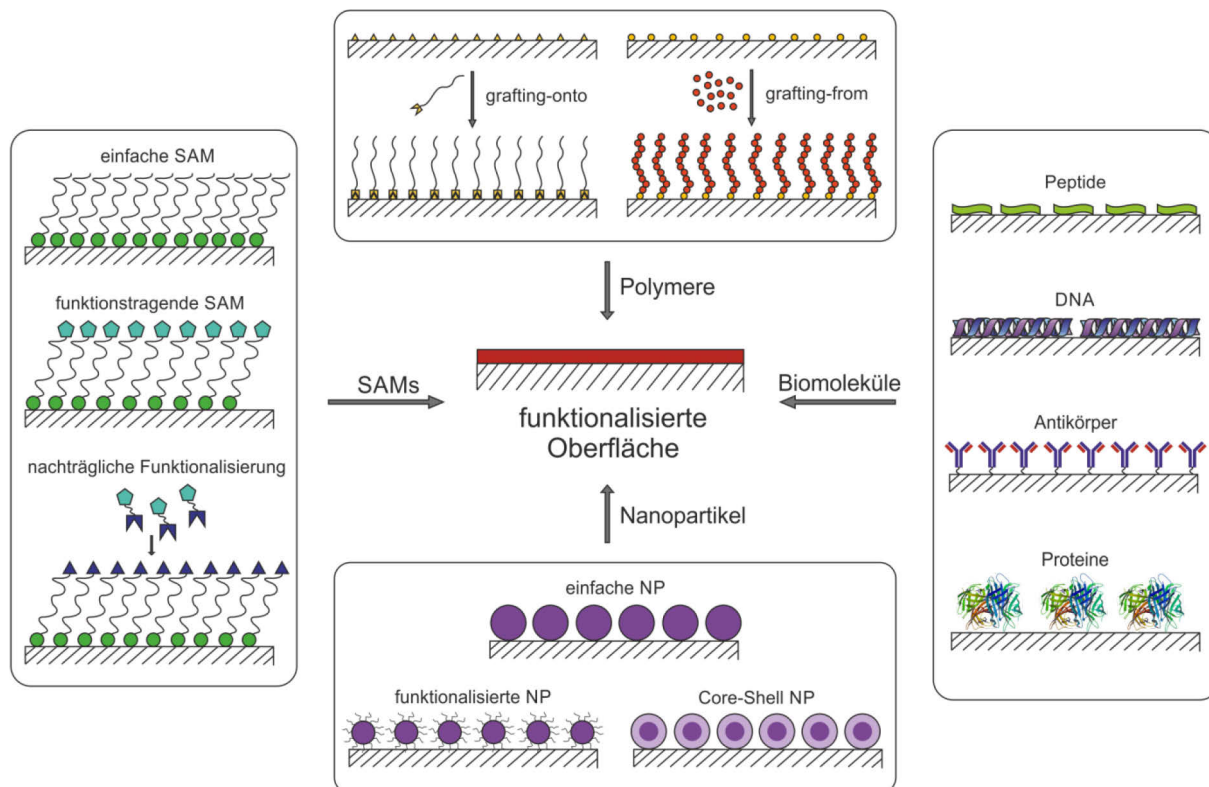
Nachdem hier die Grundlagen der Oberflächenfunktionalisierung erläutert wurden, sollen im Folgenden beispielhaft einige gebräuchliche und vor allem chemische Methoden zur homogenen Funktionalisierung von Oberflächen vorgestellt werden. Anschließend werden Möglichkeiten der strukturierten Änderung der Oberflächenfunktionalitäten vorgestellt.

### **2.2.2 Homogene Oberflächenfunktionalisierungen**

Grundsätzlich können Substratoberflächen fester Stoffe an den entsprechenden Grenzflächen entweder aus einer Lösung oder aus der Gasphase mit unterschiedlichen Molekülen funktionalisiert werden. Ein gebräuchliches Verfahren zur Beschichtung aus der Gasphase ist die chemische Gasphasenabscheidung (*chemical vapour deposition*, CVD), die vor allem zur Herstellung dünner Metall-, Halbleiter- oder Polymerschichten genutzt wird. Dabei werden gasförmige Edukte durch Energiezufuhr, meist durch thermische Aktivierung am erhitzten Substrat, in der Gasphase oder direkt an der Substratoberfläche zersetzt, wodurch sich eine dünne Schicht des entstehenden Produkts auf der Substratoberfläche abscheidet.<sup>[30]</sup> Ein großer Vorteil dieser Methode liegt in der Reproduzierbarkeit der Bildung hochreiner, gasdichter Beschichtungen. Sie bietet außerdem eine sehr gute Kontrolle über Abscheidungsraten und entstehende Morphologien durch Variation der Prozessparameter und eine gute Verarbeitbarkeit auch im großtechnischen Maßstab.<sup>[30, 31]</sup> Die größten Nachteile liegen in den teilweise sehr hohen Temperaturen, denen das entsprechende Substrat ausgesetzt ist und der Tatsache, dass nicht für jede Anwendung zerstörungsfrei verdampfbare Edukte zur Verfügung stehen. Daher ist dieses Verfahren für die Beschichtung vieler organischer Oberflächen, wie z. B. Cellulose nicht optimal geeignet.

Die nasschemische Beschichtung von Substraten bietet unzählige Möglichkeiten, Materialoberflächen kovalent oder auch nicht-kovalent zu modifizieren. Häufig werden zur Funktionalisierung selbstorganisierende Monoschichten (*self-assembled monolayers*, SAMs), Polymere, Nanopartikel oder auch Makromoleküle wie Dendrimere oder Biomoleküle (Proteine, DNA, etc.) eingesetzt (vgl.

Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1.** Schematische Darstellung einiger nasschemischer Methoden zur Oberflächenfunktionalisierung.

SAMs werden meist von organischen Molekülen auf Metalloberflächen gebildet. Die bestuntersuchten Beispiele hierfür sind Alkylsilane an Metalloxiden und Thiole an Goldoberflächen.<sup>[32-36]</sup> Generell wird dabei ein Molekül mittels einer Ankergruppe an die Substratoberfläche adsorbiert (z. B. Thiole auf Gold). An dieser Ankergruppe ist meist eine Alkylkette gebunden, die dank intermolekularer Wechselwirkungen für die geordnete Ausrichtung der einzelnen Moleküle auf der Substratoberfläche verantwortlich ist.<sup>[33, 34]</sup> An dieser Alkylkette können je nach Bedarf weitere Funktionen in das System eingebracht werden. Diese Methodik bietet zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten, bleibt aber meist doch auf die Funktionalisierung anorganischer Oberflächen beschränkt.

Die Ausbildung dünner Polymerschichten auf einer Substratoberfläche bietet dagegen ein deutlich größeres Anwendungsspektrum. Dabei kann grundsätzlich zwischen *grafting-from*- und *grafting-onto*-Strategien zur Ausbildung der Polymerschicht unterschieden werden.<sup>[37, 38]</sup> Beim erstgenannten Ansatz wachsen die Polymerketten auf der Oberfläche, indem funktionale Gruppen auf der Substratoberfläche die Polymerisation initiieren, während beim *grafting-onto*-Ansatz bereits bestehende Polymerketten, die funktionale Gruppen am Ende oder an Seitenketten tragen, auf der Oberfläche angebracht werden. Obwohl *grafting-onto*-Strategien synthetisch sehr vielfältig und geradlinig sind, haben sie auch Nachteile, da bspw. die Ausbildung dicker und sehr dichter Polymerbeschichtungen durch sterische Abstoßungen erschwert wird.<sup>[39]</sup> Für die *grafting-from*-Strategie werden häufig anionische oder kontrolliert radikalische Polymerisationstechniken wie die radikalische Polymerisation unter Atomtransfer (*atom transfer radical polymerization*, ATRP) genutzt, da diese eine präzise Einstellung von Polymerzusammensetzung, -architektur und -schichtdicke erlauben.<sup>[39-42]</sup> Weiterhin gibt es Polymerbeschichtungen, die abhängig von äußeren Einflüssen wie Temperatur, Lösungsmittel, pH-Wert, Lichteinstrahlung, Einwirkung eines elektrischen Feldes oder mechanischer Kräfte bestimmte Eigenschaften ändern und somit zu einem gewissen Grad steuerbare Funktionen aufweisen.<sup>[43-45]</sup> So können bspw. durch die Änderung der Konformation einzelner Polymerketten die Benetzbarkeit oder die Durchlässigkeit der Polymerschicht für Micro- und Nanostrukturen wie Zellen oder Nanopartikel verändert werden.<sup>[43, 44]</sup> Mithilfe von Polymeren können auch Oberflächen von Cellulosesubstraten funktionalisiert werden, um bspw. adhäsive Eigenschaften anzupassen oder reaktive funktionale Gruppen darauf anzubringen.<sup>[46]</sup> Auch die Hydrophobie der Cellulose kann durch Polymerbeschichtungen der jeweiligen Anwendungen angepasst werden.<sup>[47]</sup>

Auf die Funktionalisierung mit Peptiden wird in einem gesonderten Abschnitt ausführlich eingegangen, da diese in der vorliegenden Arbeit eine besondere Rolle einnimmt, (siehe Kapitel 2.2.4).

### **2.2.3 Strukturierte Oberflächenfunktionalisierungen**

Eine große Herausforderung liegt darin, die Funktionalisierung einer Oberfläche in bestimmten strukturierten Mustern anzuordnen. Dadurch können sich zahlreiche Vorteile gegenüber einer homogenen Funktionalisierung ergeben, indem bestimmten Bereichen unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen zugeordnet werden. Dies ist in vielen Gebieten von Forschung und Industrie von großer Bedeutung, bspw. für die Herstellung von Mikrochips, integrierten Schaltkreisen, zunehmend miniaturisierten Sensoren, elektronischen Bauteilen oder mikrofluiden Systemen.

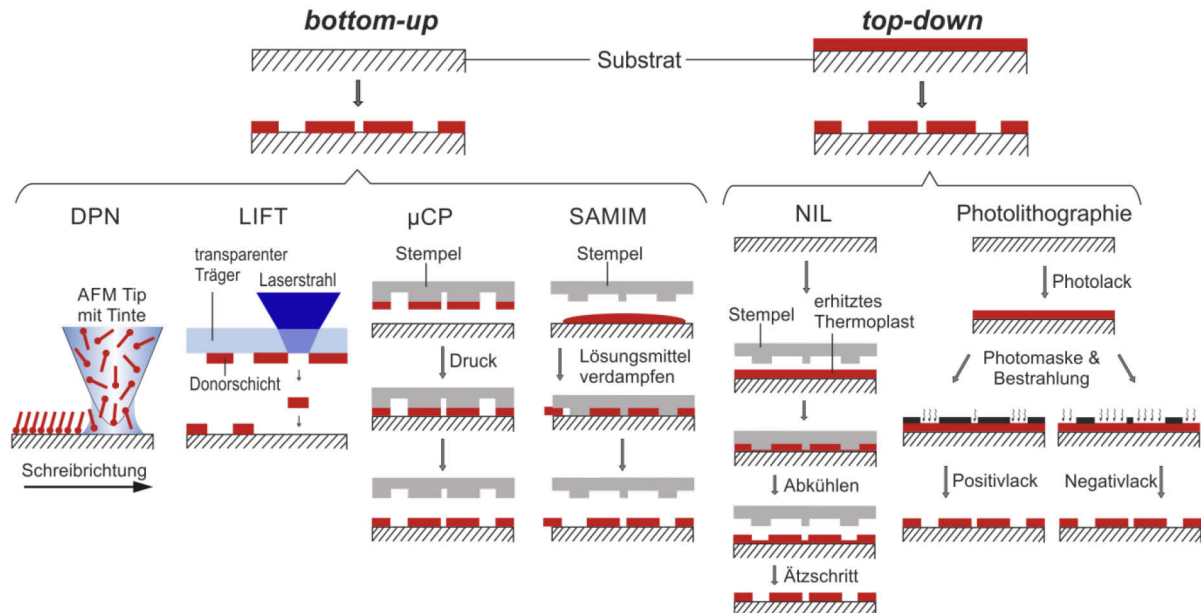
### 2.2.3.1 Lithographische und direkte Schreibmethoden

Grundlegend wird bei der Strukturierung einer Oberfläche zwischen *bottom-up*-Druckverfahren, bei denen neue Moleküle direkt auf die Oberfläche aufgetragen werden, und *top-down*-Druckverfahren, bei denen Teile einer bestehenden Oberflächenbeschichtung zerstört oder verändert werden, unterschieden (vgl. Abbildung 2.2).<sup>[48]</sup> Die meisten Methoden, die solch eine Strukturierung erlauben, können unter dem Begriff der Lithographie zusammengefasst werden. Für *top-down*-Druckverfahren wird dabei häufig der Beschuss mit energiereichen Teilchen wie bei der Elektronen- oder Ionenstrahlolithographie oder energiereicher Strahlung wie bei der Röntgen- oder Photolithographie genutzt.<sup>[49]</sup>

Photochemische Verfahren zur Strukturierung von Oberflächenfunktionalisierungen sind weit verbreitet. Die klassische Photolithographie findet seit langem Anwendung in der Halbleitertechnik, aber auch in der Forschung werden immer neue Ansätze zur Beschichtung verschiedener Oberflächen weiterentwickelt.<sup>[50-55]</sup> Das Grundprinzip der Photolithographie ist Folgendes: durch eine Photomaske werden bestimmte Teile einer vorher homogen aufgetragenen Oberflächenbeschichtung belichtet, die üblicherweise als Photolack bezeichnet wird.<sup>[56]</sup> Dadurch werden die belichteten Bereiche entweder instabil, um in nachfolgenden Schritten entfernt zu werden (Positivlack), oder sie härten aus, um die unbelichteten Bereiche anschließend entfernen zu können (Negativlack) (vgl. Abbildung 2.2). Solche Photolacke basieren meist auf organischen Polymeren, deren Bindungen unter Energiezufuhr zerstört oder quervernetzt werden.<sup>[49]</sup> Auf den vom Photolack befreiten Flächen werden anschließend neue Funktionen eingebracht oder es werden durch Ätzschritte Vertiefungen gebildet. Direkte photochemische Strukturierung ist auch ohne die Verwendung eines klassischen Photolacks möglich, indem photochemische Verbindungen auf der Oberfläche angeordnet und durch die Bestrahlung durch eine Photomaske selbst aktiviert oder deaktiviert werden. Auf diese Weise werden bspw. Polymerisationsreaktionen photochemisch kontrolliert oder es kommen photoinduzierte Click-Reaktionen zum Einsatz.<sup>[53]</sup> Weiterhin können photoschaltbare Isomerisierungsreaktionen zur Oberflächenfunktionalisierung genutzt werden.<sup>[53, 54]</sup> Interessante Arbeiten wurden auch von C. BARNER-KOWOLLIK *et al.* durchgeführt, die photoaktive Schutzgruppen wie *o*-Nitroveratrylether nutzen oder die photoinduzierte Bildung instabiler Spezies einsetzen, um diese in-situ abzufangen.<sup>[50]</sup>

Ein Nachteil photochemischer Verfahren ist die Beschränkung auf photoaktivierbare Materialien, wodurch sich nur eine eingeschränkte Kontrolle über die Oberflächenchemie bietet. Einige Biomoleküle können deshalb nur über Umwege mittels Photolithographie angeordnet werden, da sie einer direkten Bestrahlung nicht standhalten. Außerdem sind die Entwicklungskosten häufig

sehr hoch, im großtechnischen Maßstab werden zudem meist hochentwickelte Reinsträume benötigt. Ebenfalls von Nachteil kann die begrenzte minimale Auflösung sein, die vor allem bei rauen Oberflächen mit der immer weiter fortschreitenden Miniaturisierung in der Industrie nicht mehr mithalten kann.<sup>[48, 49, 57]</sup>



**Abbildung 2.2.** Schematische Darstellung etablierter Verfahren zur strukturierten Oberflächenfunktionalisierung: DPN: Dip-Pen Nanolithographie, LIFT: Laserinduzierter Vorwärtstransfer, µCP: Mikrokontaktdruck, SAMIM: lösungsmittelunterstütztes Mikroformen, NIL: Nanoprägelithographie.

Interessante Ansätze, um viele dieser Nachteile zu umgehen, bieten die sogenannten „weichen“ Lithographietechniken (*soft lithography*), die in den 1990er Jahren vor allem von G. WHITESIDES *et al.* entwickelt wurden.<sup>[57, 58]</sup> Dazu zählen Techniken wie der Mikrokontaktdruck (*microcontact printing*, µCP) oder das lösungsmittelunterstützte Mikroformen (*solvent-assisted micromolding*, SAMIM). Dabei werden als Stempel oder Form meist Elastomere aus Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) eingesetzt, welche einfach und kostengünstig herzustellen sind und über relativ große Bereiche gleichmäßigen Kontakt sogar zu leicht unebenen Oberflächen aufbauen können.<sup>[57, 59]</sup> Die Grundprinzipien dieser Methoden sind schematisch in Abbildung 2.2 veranschaulicht. Beim µCP wird eine dünne Schicht des zu druckenden Materials an der Stempeloberfläche adsorbiert und durch Pressen auf die Substratoberfläche übertragen. Beim SAMIM wird der Stempel in eine Lösung gepresst und das aufgetragene Material durch Verdampfen des Lösungsmittels ausgehärtet, bevor der Stempel wieder entfernt wird. Probleme ergeben sich bei diesen Techniken unter anderem bei zu weichen Substraten, die sich unter dem Druck des Stempels verformen können. Andererseits können auch durch die Elastizität des Stempels Probleme auftreten, wenn sich dieser ungewollt verformt.<sup>[57]</sup> Weiterhin gilt als wichtige Faustregel, dass das

funktionalisierende Material eine höhere Affinität zum Substrat als zum Stempel besitzen muss. Die Herstellung von Mustern im Nanometerbereich bleibt auch mit diesen Methoden eine große Herausforderung.

Interessante Ansätze dafür bietet die Nanoprägelithographie (*nanoimprint lithography*, NIL), bei der meist härtere Stempel bspw. aus Siliziumdioxid eingesetzt werden, um gute Auflösungen auch im Nanometerbereich zu realisieren. Dabei wird der Stempel in ein weiches thermoplastisches Polymer oder eine Lösung der Monomere gedrückt, wobei das Muster durch Abkühlen des Thermoplasts oder durch UV-Bestrahlung photochemisch aushärtet, bevor der Stempel entfernt wird.<sup>[60, 61]</sup> Allerdings ist diese Methode relativ kostenintensiv und die Herstellung der Stempel deutlich komplizierter als z.B. beim  $\mu$ CP. Weiterhin ist diese Methode auf die Funktionalisierung mit thermoplastischen Polymeren beschränkt.

Einen kostengünstigeren Weg zur Realisierung von Mustern auch im Submikrometer- oder Nanometerbereich bieten einige direkte Schreibmethoden. Dazu zählen bekannte Drucktechniken wie der Tintenstrahl- oder der Laserdruck, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird. Ein weiteres Beispiel, das sich auch für Nanostrukturierungen eignet, ist die Dip-Pen Nanolithographie (DPN).<sup>[62]</sup> Dabei wird ein Rasterkraftmikroskop (*atomic force microscope*, AFM) zur Strukturierung der Oberfläche im Sub-100-nm-Bereich genutzt, wobei verschiedene Lösungen oder Suspensionen von kleinen organischen Molekülen, Polymeren, Kolloid-Partikeln oder Metallionen zum Einsatz kommen.<sup>[62, 63]</sup> Probleme ergeben sich bei der DPN beim Einsatz von weichen oder zu rauen Substratoberflächen. Außerdem ist diese Methode nicht allgemein zugänglich, da hierfür kostenintensives Equipment benötigt wird. Andere direkte Schreibmethoden sind laserinduzierte Verfahren, die auf dem direkten Druck unterschiedlicher Materialien beruhen. Ein Beispiel dafür ist der laserinduzierten Vorwärtstransfer (*laser-induced forward transfer*, LIFT; vgl. Abbildung 2.2). Dabei wird eine dünne Donorschicht des zu druckenden Materials auf einen transparenten Träger aufgetragen und das zu bedruckende Substrat wird parallel unter der Donorschicht befestigt. Durch Einstrahlung eines Lasers durch den Träger verdampft die Donorschicht stellenweise explosionsartig und es lagern sich Teile der Donorschicht auf dem darunter liegenden Substrat wieder ab.<sup>[64]</sup> Diese Technik wird bspw. für das Drucken von OLEDs,<sup>[65]</sup> elektronischen Elementen,<sup>[66-69]</sup> Polymeren für Sensoren<sup>[70]</sup> und vor allem biologischem Material wie Zellen<sup>[71-75]</sup> genutzt. Auch bei der LIFT Technik ist das benötigte kostenintensive Equipment von Nachteil.

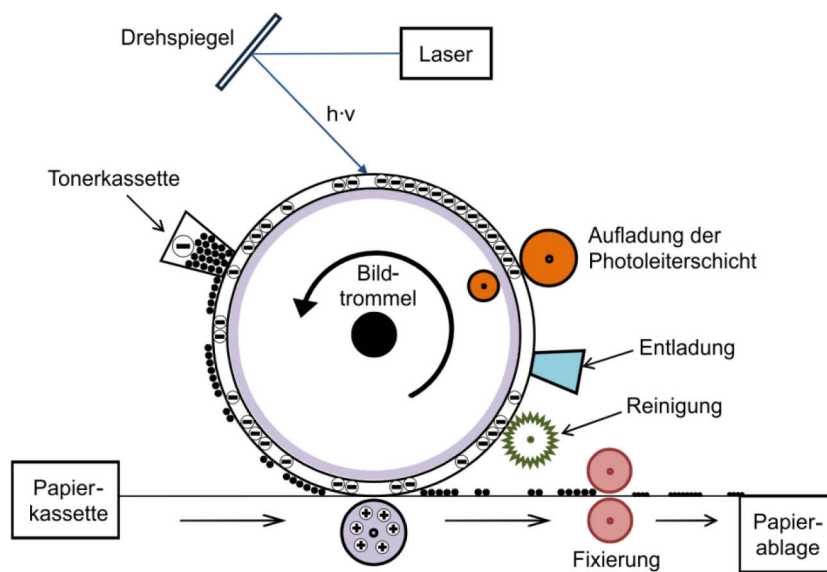
### 2.2.3.2 Der Einsatz von Druckern

Von großem Nutzen bei der Strukturierung verschiedener Oberflächen kann der Einsatz herkömmlicher Drucktechniken sein, da diese häufig leicht zugänglich, sehr effizient und weniger kostenintensiv sind. Von Vorteil gegenüber der Photolithographie und zahlreichen anderen Lithographietechniken ist vor allem, dass hier im Vorfeld keinerlei Masken oder Stempel hergestellt werden müssen. Die Übertragung des Musters geschieht computergesteuert auf elektronischem Wege. Die beiden häufigsten Drucktechniken, die hierfür in Frage kommen, sind der Laser- und der Tintenstrahldruck. Beide Techniken finden in der Forschung Anwendung in verschiedenen Bereichen und werden im Folgenden kurz erläutert.

Der Tintenstrahldruck ist eine kontaktfreie Drucktechnik, bei der einzelne Tropfen der Tinte Punkt für Punkt durch gezielten Abschuss (*drop on demand*) oder gezieltes Ablenken (*continuous ink jet*) einzelner Tropfen auf das entsprechende Substrat gedruckt werden. Dies eignet sich zur präzisen Auftragung kleinster Volumina unterschiedlicher Lösungen oder Suspensionen bis in den Pikoliter-Bereich.<sup>[76]</sup> Als Tinten werden vor allem Lösungen von Polymeren aber auch Wachse oder Suspensionen von Nanopartikeln wie Kohlenstoffnanoröhren oder Silbernanopartikel eingesetzt.<sup>[76-80]</sup> Daraus ergeben sich zahlreiche Anwendungen wie bspw. organische Leuchtdioden (*organic light emitting diode*, OLED) durch den Einsatz von Polymer- und Emittierlösungen als Tinten<sup>[81]</sup> oder auch unterschiedliche Sensoren bspw. mit Suspensionen von Nanopartikeln als Tinte.<sup>[82-84]</sup> Weiterhin kann mit Lösungen leitender organischer Moleküle als Tinte organische Elektronik hergestellt werden.<sup>[85]</sup> Auch Lösungen von Biomolekülen wie Proteinen oder DNA und sogar Suspensionen lebender Zellen werden als Tinten eingesetzt.<sup>[86-88]</sup> Auf diese Weise können z. B. Protein- und DNA-Arrays<sup>[89]</sup> hergestellt werden und es entstehen interessante Ansätze zur Gewebezüchtung (*tissue engineering*)<sup>[88]</sup>. Nachteile des Tintenstrahldrucks sind teilweise lange Entwicklungszeiten, bis die jeweilige Tinte die geforderten Eigenschaften aufweist. Denn für ein gutes Druckergebnis müssen Zusammensetzung, Löslichkeit, Viskosität, Oberflächenspannung, Schmelzpunkt und ähnliche Eigenschaften optimal abgestimmt sein. Das bedeutet, dass für neue Anwendungen im Vorfeld alle Parameter neu untersucht werden müssen, von der Wahl des passenden Substrates und der Eigenschaften der Tinte bis hin zu den Druckparametern wie der angelegten Spannung zur Tropfenbildung oder der Druckgeschwindigkeit. Auch mit optimierten Parametern sind längst nicht alle gewünschten Stoffe druckbar. Bei Polymeren entstehen Grenzen der Druckbarkeit bei zu hohen Molekulargewichten, zu vielen Verzweigungen zwischen den einzelnen Polymerketten oder ungeeigneter Polymerarchitektur.<sup>[76, 78]</sup>



Der Laserdruck beruht auf dem Prinzip der Elektrofotografie, dabei werden im Gegensatz zum Tintenstrahl Druck immer ganze Seiten in einem Arbeitsgang bedruckt (vgl. Abbildung 2.3). Dazu wird eine mit einem Photoleiter beschichtete Bildtrommel elektrostatisch aufgeladen und anschließend wird die Ladung stellenweise mittels eines Lasers wieder neutralisiert. Der Toner haftet über elektrostatische Wechselwirkungen je nach Art entweder an den neutralisierten oder an den geladenen Bereichen der Bildtrommel. Anschließend wird er durch drehen der Bildtrommel auf das Papier gedrückt. In der Fixiereinheit wird der aufgetragene Toner auf dem Papier mittels Druck und Temperatur stabilisiert. Der Toner besteht üblicherweise aus monodispersen Partikeln mit Größen im  $\mu\text{m}$ -Bereich, die sich aus einem Polymer, Farbpigmenten, magnetisierbaren Metalloxiden und anderen Additiven zusammensetzen (vgl. Kapitel 2.4.2).



**Abbildung 2.3.** Schematisch vereinfachte Darstellung des Druckvorgangs eines kommerziellen Laserdruckers.

In der Forschung findet der Einsatz solcher Laserdrucker zwar deutlich weniger Anwendung als der Tintenstrahl Druck, dennoch sollen einige ausgewählte Beispiele hier kurz vorgestellt werden. So wurde bspw. ein handelsüblicher Laserdrucker zur Herstellung mikrofluider Systeme vorgeschlagen, indem bestimmte Muster auf eine Folie gedruckt werden, welche anschließend mit einer zweiten Folie bedeckt wird und so in den nicht bedruckten Bereichen kleinste Kanäle zwischen diesen beiden Folien entstehen.<sup>[90, 91]</sup> Von der Arbeitsgruppe um H. Y. CHEN wurde ein Ansatz vorgestellt, bei dem ebenfalls auf einer Folie gedruckte Tonermuster als Positiv-Vorlage zur Herstellung eines PDMS-Stempels für einfache mikrofluide Systeme genutzt werden. Wird das PDMS auf dem gedruckten Tonermuster ausgehärtet und anschließend vorsichtig von der Folie entfernt, entstehen dort, wo der Toner war, kleinste Kanäle mit einer Tiefe von ca.  $10\ \mu\text{m}$  und einer Breite von mindestens  $60\ \mu\text{m}$ .<sup>[92]</sup> Zur Herstellung von mikrofluiden Einwegventilen

nutzten A. J. RICCO *et al.* einen handelsüblichen Laserdrucker und einen Festkörperlaser. Dazu wurden schwarze Punkte auf unterschiedliche thermoplastische Polymerfolien gedruckt und diese durch Laminierung in mikrofluide Systeme eingebaut. An den bedruckten Stellen entstehen so anfangs geschlossene Ventile, die gezielt durch Einstrahlung eines Lasers geöffnet werden können, indem die optische Energie in Wärmeenergie umgewandelt wird und den schwarzen Toner aufschmilzt, wodurch auch die darunter liegende thermoplastische Folie aufgeschmolzen und das vorher geschlossene Ventil geöffnet wird.<sup>[93]</sup> F. BREITLING *et. al.* nutzten in einem interessanten Ansatz einen modifizierten Farblaserdrucker zur kombinatorischen Synthese von Peptid-Arrays auf Glaträgern. Dieser Drucker konnte 20 verschiedene Aminosäuren drucken, die bei Raumtemperatur in festen Tonerpartikeln an der gewünschten Stelle positioniert wurden. Anschließend wurde der Toner durch Erhitzen aufgeschmolzen und die Kupplungsreaktionen gestartet. Dies ermöglichte die schnelle, flexible und kostengünstige Synthese großer Peptidarrays nach Standard Fmoc-Strategie.<sup>[94]</sup> Kürzlich gelang J. YANG und Kollegen auch die Herstellung von Elektronik mittels eines Laserdruckers und eines modifizierten Toners. Dafür wurden Katalysatoren in den Toner mit eingebaut, die anschließend eine stromlose Ablagerung von Kupfer auf der Tonerschicht erlaubten, wodurch die gedruckten Muster leitende Eigenschaften aufwiesen.<sup>[95]</sup>

Einige der hier vorgestellten Anwendungen nutzen nicht nur einen kommerziellen Laserdrucker sondern auch kommerziellen Toner. Solche Ansätze bieten entscheidende Vorteile gegenüber anderen vorgestellten Methoden. Sie sind kostensparend, leicht zugänglich und umsetzbar sowie zur schnellen Generierung unterschiedlichster Muster auf verschiedenen Substraten geeignet.

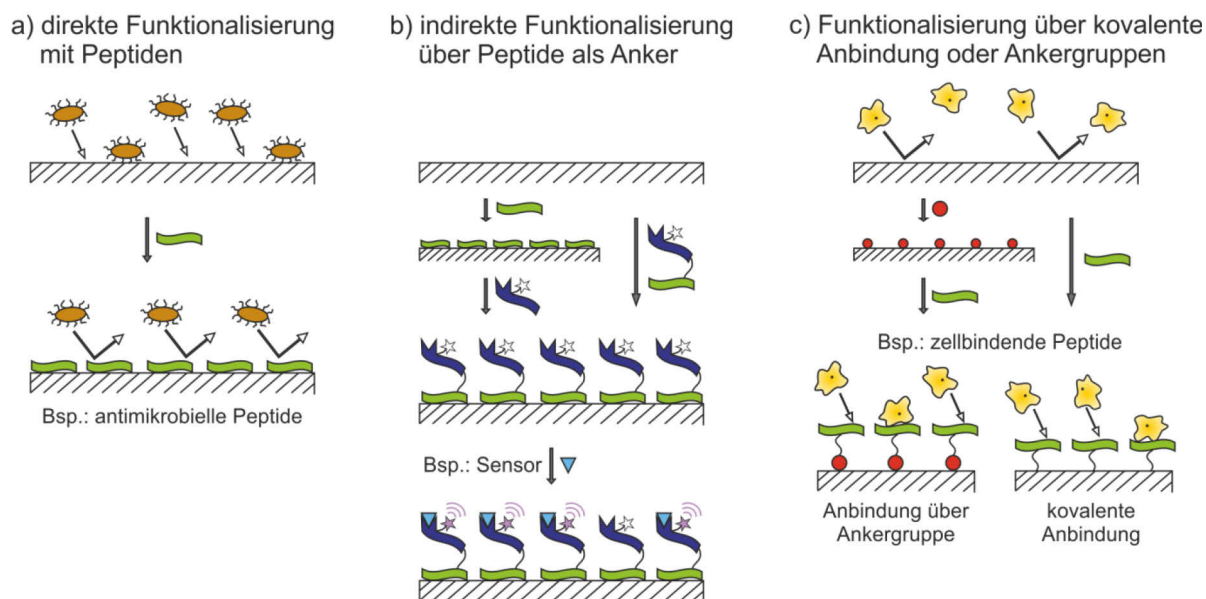
#### **2.2.4 Funktionalisierung mittels spezifisch bindender Peptide**

In den letzten Jahrzehnten wurden zunehmend auch Peptide eingesetzt, um verschiedene Oberflächen zu funktionalisieren.<sup>[96]</sup> Diese bringen aufgrund ihrer Zusammensetzung aus verschiedenen Aminosäuren (AS) eine seltene Komplexität und Selektivität mit sich und können teilweise sehr spezifische Wechselwirkungen mit unterschiedlichsten Materialien eingehen.<sup>[96-99]</sup> Nach dem Vorbild der Natur, in der sequenzspezifische Bindungen zwischen Antikörpern und Antigenen oder Enzymen und deren Substraten entstehen, wird auch in den Materialwissenschaften zunehmend nach spezifischen Bindern zur Beschichtung sowohl organischer als auch anorganischer Substrate gesucht. Es wurden bis heute zahlreiche Peptide selektiert, die unterschiedlichste Oberflächen funktionalisieren,<sup>[99-101]</sup> vor allem verschiedene Metalle und Metalloxide<sup>[102-105]</sup> oder auch synthetische und natürliche Polymere<sup>[106-110]</sup>. So wurden z. B. Peptide selektiert, die spezifisch leitende Polymere binden,<sup>[110]</sup> die in der Lage sind zwischen

Polymeren unterschiedlicher Taktizität zu differenzieren<sup>[107, 109, 111]</sup> oder die während der Kristallisation anorganischer Materialien bestimmte Kristallmodifikationen binden und somit zur Steuerung von Kristallisationsprozessen beitragen können<sup>[112-114]</sup>. Zusätzlich ergeben sich durch spezifisch bindende Peptide Anwendungen in Bereichen wie der molekularen Biomimetik<sup>[115-117]</sup> oder der (Nano-)Biotechnologie.<sup>[96, 97, 103, 115, 118-120]</sup>

Die Adsorption zum Substrat beruht dabei meist auf der Physisorption der Peptide durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische, hydrophobe und polare Wechselwirkungen.<sup>[118, 121]</sup> Aber natürlich können die Peptide auch kovalent bspw. über Disulfidbrücken an der Substratoberfläche verankert werden.

Grundsätzlich kann zwischen drei verschiedenen Arten von Oberflächen funktionalisierenden Peptiden unterschieden werden: a) Peptide, die direkt für die Adsorption an die Substratoberfläche verantwortlich sind und diese gleichzeitig mit neuen, gewünschten Eigenschaften dekorieren; b) Peptide, die eigenständig an der Oberfläche adsorbieren, aber in erster Linie als Anker für neue Funktionalitäten dienen, die im Vorfeld oder nachträglich durch Kupplung an das Peptid auf der Oberfläche aufgebracht werden; c) Peptide, die selbst keine besondere Affinität zur Oberfläche aufweisen und auf dieser über kovalente Bindungen oder Ankergruppen befestigt werden müssen, um die gewünschte Funktionalisierung zu erzielen (vgl. Abbildung 2.4). Natürlich sind auch Kombinationen dieser Möglichkeiten denkbar. So wurden bspw. Graphen-bindende Peptide genutzt, um mithilfe funktionaler Bipeptide Graphen-basierte Sensoren für den Sprengstoff Trinitrotoluol (TNT)<sup>[122]</sup> oder auch pathogene Bakterien<sup>[123]</sup> zu realisieren. In diesem Fall zählen die Graphen-bindenden Peptide zur Variante b), während das TNT-bindende bzw. das antimikrobielle Peptid der Kategorie c) zuzuordnen ist. Weiterhin gibt es zahlreiche Anwendungen zur Funktionalisierung unterschiedlicher Oberflächen wie z. B. synthetischer Implantate mit dem zellbindenden Motiv RGD (R: Arginin, G: Glycin, D: Asparagin), das meist über kovalente Amidbindungen an den Oberflächen angebracht wird (Kategorie c)).<sup>[124, 125]</sup> Auch gegenteilige Ansätze, die das Zellwachstum auf verschiedenen Oberflächen verhindern sollen (Antifouling), lassen sich durch Peptidbeschichtungen verwirklichen (a) oder b)).<sup>[104, 126]</sup> Im folgenden Kapitel werden einige Wege vorgestellt, solche spezifisch an bestimmten Oberflächen bindenden Peptide zu selektieren.



**Abbildung 2.4.** Schematische Darstellung zu drei verschiedenen Arten von Oberflächen funktionalisierenden Peptiden: a) oberflächenbindende Peptide zur direkten Funktionalisierung (z. B. antimikrobielle Beschichtung); b) oberflächenbindende Peptide als Anker zur indirekten Funktionalisierung (z. B. funktionale Bipeptide als Sensoren); c) nicht oberflächenbindende Peptide zur Funktionalisierung über Ankergruppen oder kovalente Bindung an die Oberfläche (z. B. Zelladsorption über RGD-Motiv).

## 2.3 Selektion spezifisch bindender Peptide

### 2.3.1 Rationales Design und kombinatorische Möglichkeiten

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, spezifische Binder für die unterschiedlichsten Systeme zu finden. Generell lassen sich dabei zwei grundlegende Strategien unterscheiden, die sich bei Bedarf auch kombinieren lassen: das rationale Design gesuchter Bindungsmotive und kombinatorische Möglichkeiten. Ersteres beruht auf der genauen Kenntnis der Substratoberfläche, während bei letzterem die besten Binder für das jeweilige Substrat aus großen Bibliotheken unterschiedlicher Stoffklassen selektiert werden.

Für das rationale Design spezifischer Binder wird grundsätzlich das Wissen über bereits bekannte Bindungsmotive eingesetzt.<sup>[127]</sup> Häufig werden weiterhin Computersimulationen zur Hilfe genommen, um bekannte oder auch *de novo* Peptidstrukturen rechnerisch an die Substratoberfläche anzupassen.<sup>[128-130]</sup> Dabei wird unter anderem auch die Ausbildung funktionaler Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter genutzt, wodurch spezifische makromolekulare Systeme entstehen können.<sup>[128, 131, 132]</sup> Das rationale Design erfordert allerdings präzise Kenntnisse über die Beschaffenheit und strukturelle Eigenschaften der Substratoberfläche, um die Peptidstruktur dieser anpassen zu können. Zudem müssen, je komplexer die Substratoberfläche ist, immer mehr Näherungen und Schätzungen eingesetzt werden, wodurch

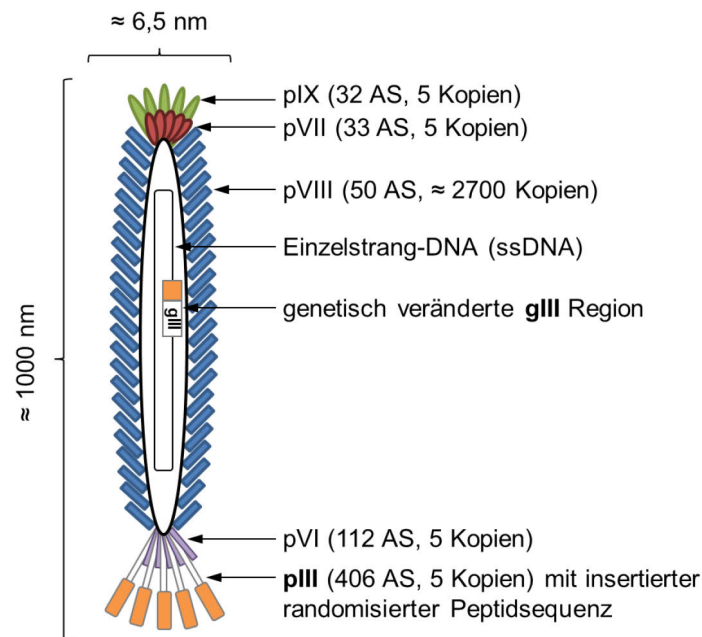
Computersimulationen schnell ineffizient oder zu ungenau werden. Häufig steht ein sich mehrfach wiederholender Kreislauf aus computergestützter oder rein rationaler Optimierung der Peptidstruktur und experimenteller Validierung der Bindungseigenschaften zum Substrat hinter einem erfolgreichen Peptiddesign.<sup>[127, 133, 134]</sup>

In vielen Fällen ist der Einsatz kombinatorischer Bibliotheken von Vorteil, da dieser nicht zwangsläufig eine genaue Kenntnis der Substratbeschaffenheit voraussetzt und auch zeitlich effektiver sein kann.<sup>[133-135]</sup> Es gibt verschiedene synthetische Stoffbibliotheken, die hierfür herangezogen werden können. Diese setzen sich meist aus unterschiedlichen Kombinationen einiger einfacher Anfangsbausteine zusammen. Es gibt Polymer- und Peptidbibliotheken oder auch rekombinante Bibliotheken wie sie bspw. im Phagen-Display verwendet werden. Durch entsprechende Screening-Verfahren werden aus solchen Bibliotheken Bindungsmotive für verschiedene Substrate teilweise durch iterative Kreisläufe selektiert. Das Phagen-Display wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit als Selektionsmethode gewählt, da es heutzutage eine weitverbreitete, kommerzialisierte und vielfältig anwendbare Technik darstellt. Im Folgenden Kapitel werden dessen Grundlagen näher erläutert.

### 2.3.2 Phagen-Display

Das Phagen-Display Screening ist eine biokombinatorische Technik, die in den letzten 30 Jahren wachsendes Interesse in vielen Bereichen der Forschung erfahren hat. Ihren Grundstein legte G. P. SMITH 1985, als er erstmals künstliche Peptidsequenzen in Hüllproteine von filamentösen Bakteriophagen einbaute ohne deren Funktionalität zu beeinträchtigen.<sup>[136, 137]</sup> Seitdem werden Bakteriophagen als Standard-Expressionsvektoren zur Herstellung großer Peptidbibliotheken genutzt und es wurden zahlreiche, auch kommerzielle Phagenbibliotheken entwickelt. Das Grundprinzip ist dabei immer gleich: es werden unterschiedlich lange randomisierte, künstliche Sequenzen in ein Hüllprotein der Phagen insertiert, die dann als potentielle Binder für unterschiedliche Substrate dienen.<sup>[138-141]</sup> Am häufigsten werden hierfür filamentöse M13 Bakteriophagen eingesetzt, da diese zu den bestuntersuchten Phagen zählen, leicht replizierbar sind und große Mengen an Fremd-DNA aufnehmen können.<sup>[142-144]</sup> Abbildung 2.5 zeigt den schematischen Aufbau eines solchen Bakteriophagen aus fünf verschiedenen, unterschiedlich großen Hüllproteinen und der davon umschlossenen zirkulären Einzelstrang-DNA. Den Hauptbestandteil des Phagenkörpers bilden ca. 2700 Kopien des zentralen Hüllproteins pVIII, welche durch hydrophobe Wechselwirkungen in helikaler Anordnung zusammen gehalten werden. An den Enden befinden sich jeweils fünf Kopien der Proteinpaare pVII und pIX bzw. pIII und pVI.<sup>[142, 143]</sup> Letztere sind entscheidend für die strukturelle Stabilität des Bakteriophagen und

häufig trägt das pIII Protein *N*-terminal die künstlich insertierte Peptidsequenz.<sup>[142]</sup> Diese wird durch den Einbau randomisierter DNA in das entsprechende gIII Gen kodiert, wodurch ein einzelner Phage immer fünf Kopien derselben Peptidsequenz besitzt, was zu multivalenten Bindungseffekten am Substrat führen kann. Die Länge der eingebauten Peptidsequenz kann variieren. Es wurde bisher mit Längen zwischen 6 und 43 Aminosäuren gearbeitet, in kommerzielle Bibliotheken werden jedoch meist 7- oder 12-mer Sequenzen eingesetzt.<sup>[139]</sup>



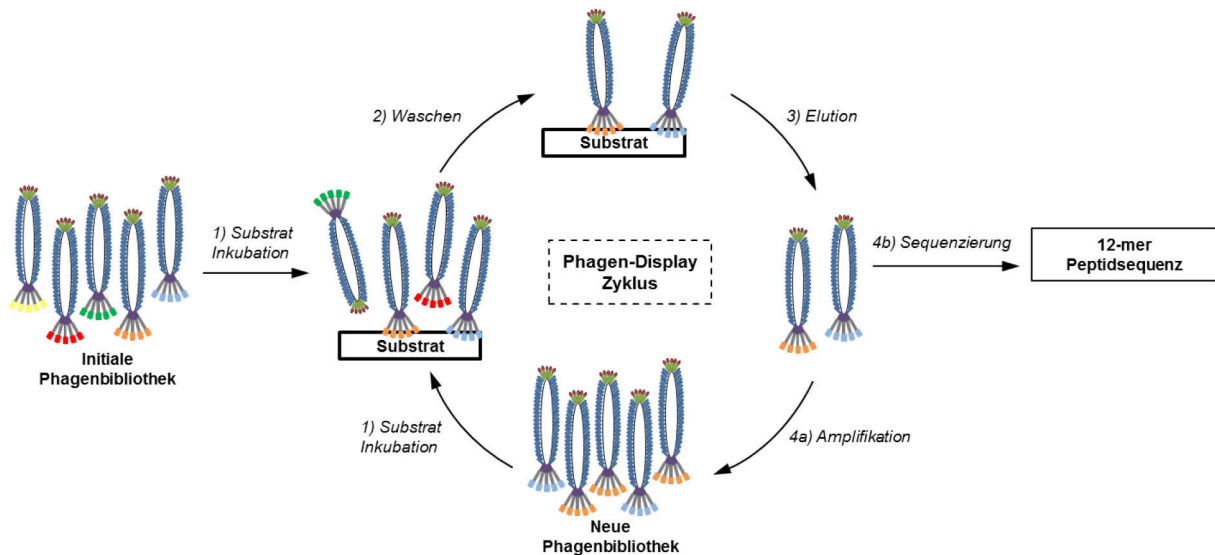
**Abbildung 2.5.** Schematische Darstellung eines einzelnen M13 Bakteriophagen mit den äußeren Hüllproteinen und der singulären Einzelstrang-DNA mit der veränderten gIII-Region, welche die *N*-terminal an pIII insertierte Peptidsequenz kodiert.

Die Phagen sind Viren, d. h. sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel und Replikationsapparat und sind daher auf Wirtszellen angewiesen, um sich zu vermehren. Dieser Vorgang wird als Amplifikation bezeichnet. Die M13 Bakteriophagen nutzen das *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterium als Wirtszelle. Das Protein pIII spielt dabei eine zentrale Rolle, da es den Eintritt des Phagenklons in die Wirtszelle vermittelt, indem der *N*-terminale Teil des Proteins an den F-Pilus des Bakteriums, ein sich außerhalb der Zelle befindliches Anhängsel, bindet.<sup>[142]</sup>

Es gibt unterschiedliche, kommerziell erhältliche Phagenbibliotheken. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer M13 12-mer Phagenbibliothek von NEW ENGLAND BIOLABS gearbeitet. Der Einsatz von 12-mer Sequenzen als potentielle Bindungsdomänen für die Substratoberfläche hat gegenüber von 7-meren den Vorteil, dass hier mehr Funktionalitäten für mögliche Wechselwirkung mit der Oberfläche präsentiert werden. Durch den Einsatz aller 20 kanonischen Aminosäuren ergibt sich für solch eine Bibliothek eine theoretische Sequenzvielfalt von

$20^{12}$  ( $\approx 4 \cdot 10^{15}$ ) Peptiden. Allerdings entspricht der tatsächliche Sequenzraum aufgrund von unterschiedlichen Einbauraten der einzelnen Aminosäuren lediglich  $\sim 1 \cdot 10^9$  unterschiedlichen Sequenzen.<sup>[145, 146]</sup>

Der Prozess des Phagen-Displays ist ein beliebig oft wiederholbarer Kreislauf, wobei durch jede neue Wiederholung eine zunehmend spezifischere Phagenbibliothek entstehen sollte (vgl. Abbildung 2.6). Nach Standardprotokoll wird dabei als erstes das gewählte Substrat der Phagenbibliothek ausgesetzt (Abbildung 2.6, Schritt 1). Dieser Vorgang wird als Inkubation bezeichnet und kann durch entsprechende Wahl der äußeren Bedingungen so variiert werden, dass unspezifische Wechselwirkungen zwischen Phagenklon und Substratoberfläche minimiert werden. Dazu werden bspw. die Inkubationszeit, der pH-Wert oder die Temperatur angepasst oder bestimmte Detergenzien zugegeben, die unspezifische Bindungsstellen blockieren sollen. Anschließend werden in mehreren Waschschritten alle nicht oder nur schwach am Substrat bindenden Phagen gewaschen und danach die stark am Substrat haftenden Phagen eluiert (Abbildung 2.6, Schritt 2 und 3). Zur Elution können folgende Hilfsmittel genutzt werden: a) drastische Änderung der äußeren Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke, etc.); b) kompetitive Elution mit einem bekannten, starken Binder für das Substrat; c) Elution durch proteolytische Bindungsspaltung. Die letztgenannte Methode garantiert auch die Elution sehr stark bindender Phagen, die bei einer häufiger eingesetzten Änderung des pH-Wertes möglicherweise weiter am Substrat haften würden. Dafür kann bspw. das Enzym Trypsin eingesetzt werden, welches die Elution durch den Verdau des pIII Proteins ermöglicht. Durch Amplifikation der nun reduzierten Bibliothek stark bindender Phagen mittels *E.coli* Bakterien wird eine neue, substratspezifischere Bibliothek hergestellt (Abbildung 2.6, Schritt 4a), die in einem weiteren Zyklus erneut mit dem Substrat inkubiert wird. Der gesamte Phagen-Display Zyklus wird üblicherweise drei bis fünf mal wiederholt. Schließlich werden die substratbindenden Peptidsequenzen ermittelt, indem die DNA einzelner Phagenklone sequenziert wird (Abbildung 2.6, Schritt 4b).



**Abbildung 2.6.** Schematisch vereinfachte Darstellung des Phagen-Displays: 1) das Substrat wird mit der initialen Phagenbibliothek inkubiert, 2) gewaschen und 3) die am Substrat haftenden Phagen werden eluiert und 4a) amplifiziert; durch wiederholtes Vorgehen entsteht eine zunehmend spezifischere Phagenbibliothek; nach mehreren Zyklen erfolgt die Analyse der bindenden Peptidsequenzen durch 4b) DNA-Sequenzierung der eluierten Phagenklone.

Obwohl das Phagen-Display ursprünglich eher zur Selektion von biologischen Bindern für Substrate wie Antikörper, Proteine oder Enzyme entwickelt wurde und auch heute noch vielfältig dafür genutzt wird,<sup>[137, 138, 147-149]</sup> haben sich in den letzten 20 Jahren auch interessante Anwendungen in anderen Bereichen der Forschung ergeben.<sup>[101, 106, 139, 143, 150]</sup> Auch cellulosebindende Peptide wurden bereits mittels Phagen-Display identifiziert, auf diese wird in Kapitel 2.4.2 näher eingegangen.

Dank seiner Vielfältigkeit und leichten Handhabung konnte sich das Phagen-Display zu einer viel genutzten Methode zur Selektion spezifisch bindender Peptide für alle Bereiche der Forschung entwickeln.

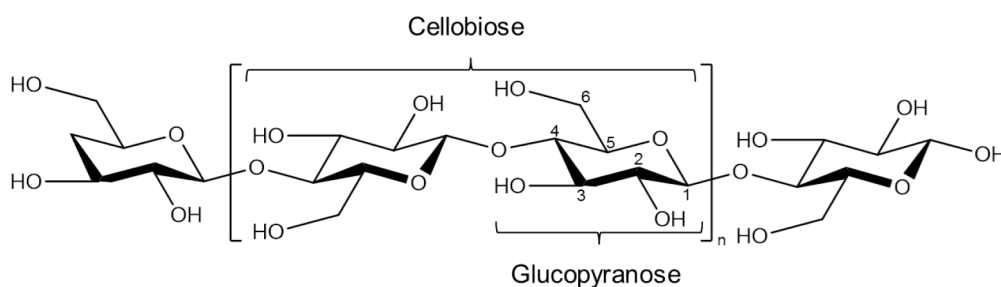
## 2.4 Das verwendete System: bedrucktes Papier

Nachdem nun die Grundlagen zur Oberflächenfunktionalisierung und zur Selektion spezifisch bindender Peptide ausführlich erläutert wurden, werden in diesem Abschnitt die für die vorliegende Arbeit relevanten Oberflächen Papier bzw. Cellulose und Toner näher betrachtet. Anschließend werden bekannte Funktionalisierungsmöglichkeiten für diese Oberflächen vorgestellt und diskutiert.



### 2.4.1 Zusammensetzung und Aufbau von Cellulose und Papier

Cellulose ist ein ubiquitäres Biopolymer, das als Hauptbestandteil pflanzlicher Zellwände das weltweit am häufigsten vorkommende Polysaccharid darstellt. Seit Jahrhunderten wird sie zur Papier- und Textilherstellung genutzt. Chemisch betrachtet ist Cellulose ein lineares, syndiotaktisches Homopolymer aus  $\beta$ -D-Glucopyranose Einheiten, die über  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind (vgl. Abbildung 2.7). Dabei ist jede zweite Einheit um  $180^\circ$  gedreht, um die bevorzugten Bindungswinkel der Acetal-Bindungsbrücke zu gewährleisten, wodurch zwei Glucopyranose Einheiten den eigentlichen Grundbaustein der Cellulose, die Cellobiose, bilden.<sup>[151]</sup>



**Abbildung 2.7.** Strukturformel von Cellulose in Sesselschreibweise mit dem Polymerisationsgrad  $DP = 2n + 2$ .

Die Kettenlänge der Cellulose, häufig auch angegeben als Polymerisationsgrad (*degree of polymerization*, DP) bezogen auf die Glucopyranose Einheiten, ist abhängig von ihrem natürlichen Ursprung. So hat Cellulose im Zellstoff, der zum Großteil aus Holz hergestellt wird, meist einen Polymerisationsgrad von 300 bis 1700, während Cellulose, die aus Baumwolle oder auch Bakterien gewonnen wird je nach Behandlungsart Werte von 800 bis 10 000 aufweisen kann.<sup>[152]</sup> Die zahlreichen Hydroxylgruppen entlang einer Cellulosekette sind in der Lage intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aufzubauen und bewirken dadurch eine mechanische Stabilität. Somit entstehen reißfeste Fasern, die in der Natur häufig für die Stabilität von Pflanzen verantwortlich sind.<sup>[153]</sup> Cellulose kann in unterschiedlichen amorphen oder kristallinen Strukturen auftreten: Cellulose I $_{\alpha}$  & I $_{\beta}$  sind die natürlichen Formen, während Cellulose II die thermodynamisch stabilste Form darstellt, weiterhin wird zwischen Cellulose III $_I$  & III $_{II}$  und IV $_I$  & IV $_{II}$  unterschieden.<sup>[152, 153]</sup>

Ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften machen die Cellulose zu einem vielversprechenden Kandidaten für zahlreiche Forschungszweige, da sie mechanisch und auch thermisch stabil, hydrophil, biokompatibel, bioabbaubar und chemisch vielfältig funktionalisierbar ist.<sup>[152, 154, 155]</sup> Cellulosefasern werden bspw. genutzt, um verstärkte

Kompositwerkstoffe mit verschiedenen Kunststoffen herzustellen<sup>[156, 157]</sup> und mikrobielle Nanocellulose kann als Ausgangsstoff für biomedizinische Anwendungen genutzt werden.<sup>[158]</sup> Diese mikrobielle Nanocellulose weist wie auch Cellulose-Nanofasern pflanzlichen Ursprungs durch ein effizienteres Verhältnis von Oberfläche und Volumen andere Eigenschaften auf als herkömmliche Cellulosefasern.<sup>[159-162]</sup> Dadurch bietet sie viele Möglichkeiten, herkömmliche Anwendungen von Cellulose zu verbessern und das Anwendungsspektrum zusätzlich zu erweitern. Nanocellulose wird bspw. als effizientere Verstärkung in Adhäsiven und Kompositwerkstoffen oder zur Herstellung optisch transparenten Papiers für elektronische Bildschirme eingesetzt.<sup>[161, 163, 164]</sup>

Ein großer Vorteil von Cellulose ist ihre gute Bioverträglichkeit und Bioabbaubarkeit, wodurch sie zur Herstellung biomedizinischer und umweltverträglicher Materialien immer mehr genutzt wird.<sup>[165, 166]</sup> Seit einigen Jahren werden bspw. zunehmend auch reine Cellulose-Komposite aus unterschiedlichen Strukturen und Morphologien von Cellulose untersucht (*all-cellulose composites*), in denen Cellulose sowohl als Matrix als auch als zugesetzte Verstärkung eingesetzt wird.<sup>[167, 168]</sup>

Durch die chemische Umsetzung der Hydroxylgruppen der Celluloseketten, bspw. durch Veresterung, entstehen neue Werkstoffe mit anderen physikalischen und chemischen Eigenschaften wie verbesserter Löslichkeit und Verarbeitbarkeit. Dabei gehören Celluloseacetate und Cellulosenitrate industriell wohl zu den wichtigsten Vertretern.<sup>[154, 169, 170]</sup> Nach dem Vorbild der Natur, in der Mikroorganismen Cellulose als Kohlenstoffquelle nutzen, gibt es auch zahlreiche Bemühungen, Cellulose als erneuerbare Quelle für Kraftstoffe wie Bioethanol und andere Anwendungen einzusetzen.<sup>[171-173]</sup> Allerdings ist der Abbau von Cellulose, sowohl auf biologischem Wege durch Enzyme wie Cellulasen als auch auf synthetischem Wege, sehr komplex und eine ökologische und gleichzeitig wirtschaftliche Nutzung stellt Wissenschaftler vor interdisziplinäre Herausforderungen.<sup>[174, 175]</sup>

Cellulose ist auch der Grundstoff für die Herstellung von Papier, einem sehr vielfältigen Werkstoff, der in zahlreichen Modifikationen und optimiert auf jeweilige Anwendungen produziert wird. Cellulose zur Papierherstellung wird meist aus unterschiedlichen pflanzlichen Ausgangsmaterialien oder Altpapier gewonnen. Neben der Cellulose als Faserstoff sind in herkömmlichem Druckerpapier zusätzlich Füllstoffe wie Kaolin, Calciumcarbonat oder Titanweiß und Additive wie Pigmente, Binde-, Leimungs- und Retentionsmittel enthalten. Diese sorgen unter anderem für einen besseren Zusammenhalt der Cellulosefasern, füllen teilweise die Lücken im sonst relativ porösen Material aus und steuern mechanische, optische und chemische

Eigenschaften des Papiers. Vor allem durch Leimungsmittel wird auch die Hydrophilie bzw. Hydrophobie gesteuert und somit die Bedruck- und Beschreibbarkeit des Papiers je nach Verwendungszweck optimiert. Dafür wird unter anderem Carboxymethylcellulose hinzugegeben, da diese irreversibel an der unfunktionalisierten Cellulose adsorbiert und dadurch einzelne Fasern miteinander verknüpfen kann.<sup>[176]</sup> Abgesehen von den herkömmlichen Anwendungen von Papier im Haushalts- und Bürobedarf gibt es auch zahlreiche Forschungsarbeiten, die Papier als günstiges Ausgangsmaterial für die unterschiedlichsten Bereiche vorschlagen. Einige davon werden in Kapitel 2.4.3 vorgestellt und näher erläutert.

## **2.4.2 Funktionalisierung von Cellulose**

Cellulose kann sehr vielfältig funktionalisiert werden. Vielversprechende Ansätze bieten dafür z. B. von der Natur inspirierte Systeme. Denn da Cellulose eines der häufigsten natürlichen Polysaccharide darstellt, haben verschiedene Organismen wie Bakterien und Pilze Wege entwickelt, sich dieses ubiquitäre Material als Kohlenstofflieferant und Energiequelle nutzbar zu machen. Entscheidend für den Celluloseabbau sind dabei verschiedene Enzyme wie die Cellulasen oder große Multi-Enzymkomplexe, sogenannte Cellulosome. Diese sind wiederum aus einem oder mehreren katalytischen Domänen, die für den Abbau der Cellulose zuständig sind, und einer oder mehrerer Cellulose-Bindungsdomänen (CBD) aufgebaut.<sup>[177]</sup> Letztere vermittelt die Bindung zwischen Enzym und Substrat und trägt somit entscheidend zur Effizienz des jeweiligen Enzyms bei. Die CBDs können aufgrund ihrer Struktur und Bindungseigenschaften in verschiedene Familien unterteilt werden. Ihr Größe variiert, sie können aus ca. 30 bis zu 180 Aminosäuren aufgebaut sein.<sup>[29, 178, 179]</sup> Wirtschaft und Forschung haben sich diese sehr spezifischen Bindungsdomänen für die Textil- und Papierindustrie zu nutzen gemacht.<sup>[177-181]</sup> Einige CBDs binden reversibel an Cellulose und können daher zur Auftrennung und Reinigung von Proteinen oder in Biosensoren genutzt werden, während andere CBDs irreversibel an ihr jeweiliges Cellulosesubstrat binden und für Anwendungen, die eine Immobilisierung erfordern, genutzt werden.<sup>[29, 175, 182, 183]</sup> So konnten bspw. Protein- und Antikörper-Bibliotheken an Cellulosesubstraten hergestellt oder das Zellwachstum auf Cellulosesubstraten für biomedizinische Anwendungen verbessert werden.<sup>[184-188]</sup>

Da solche CBDs aber relativ große Moleküle darstellen und ihre Herstellung bzw. Aufreinigung über enzymatische Proteolyse oder rekombinante DNA-Technologie relativ aufwendig sein kann, wird zunehmend nach kürzeren Bindungsdomänen für Cellulosesubstrate gesucht. Einen Ansatz hierfür stellten G. GOOBES, H. SENDEROWITZ *et al.* vor, indem sie computergestützte

Berechnungen durchführten, um kürzere CBD Mimetika zu erhalten. Auf diesem Weg fanden sie einige 18-mer Peptide, die ein gutes Bindungsverhalten zur Cellulose aufwiesen.<sup>[173]</sup>

Auch mittels Phagen-Display konnten einige, noch kürzere Bindungsmotive für Cellulose identifiziert werden (vgl. Tabelle 2.2).<sup>[171, 189, 190]</sup> In einer Arbeit von T. SERIZAWA *et al.* wurden verschiedene Heptapeptide vorgestellt, die anhand ihrer Sequenzen in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Bindungsmotiven unterteilt wurden. Die erste Gruppe zeigte stärkere Bindungen zur Cellulose und enthielt an erster und fünfter Position bevorzugt polare Hydroxylgruppen-tragende Aminosäuren (Ser, Thr, Tyr) und an siebter Position basische Aminosäuren (His, Arg, Lys), weshalb Wechselwirkungen zur Cellulose über Wasserstoffbrückenbindungen postuliert wurden. Die zweite Gruppe mit etwas schwächeren Bindungsaffinitäten enthielt hauptsächlich aliphatische Aminosäuren, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen zur Cellulose ausgebildet werden können. Die Bindungsaffinitäten zur Cellulose wurden mittels Phagen-ELISA quantifiziert.<sup>[171]</sup> Dabei zeigte das Peptid HAIYPRH, das keiner dieser beiden Gruppen so recht zuzuordnen ist, zwar die größte Bindungsaffinität, allerdings wurde diese Sequenz auch in zahlreichen anderen Studien bereits als potentieller Binder für unterschiedlichste Materialien identifiziert und ist daher vermutlich eine unspezifische Bindungssequenz (*target unrelated peptide*, TUP).<sup>[138, 191]</sup> In einer anderen Arbeit entwickelten J. YANG *et al.* ein Dispersions- und Bindemittel für Druckertinte, indem sie ein Peptid aus drei funktionalen Blöcken aufbauten: einer Bindungssequenz für Cellulose (THKTSTQRLLAA), einer Bindungssequenz für Ruß (FHENWPS) als Pigment in der Tinte und einer hydrophilen Linkersequenz ((PT)<sub>11</sub>P), welche diese beiden miteinander verband. Bindungssequenzen für Cellulose und Ruß wurden mittels Phagen-Display identifiziert und ihre Bindungsaffinitäten mittels Phagen-ELISA und einem Alaninscan analysiert.<sup>[189]</sup> Danach wurde postuliert, dass hauptsächlich hydrophile Wechselwirkungen die Bindung zur Cellulose bewirken und die Aminosäuren K<sup>3</sup>, Q<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, L<sup>9</sup>, L<sup>10</sup> innerhalb der Bindungssequenz für Cellulose besonders wichtig sind. Später identifizierten J. M. CATCHMARK *et al.* ein weiteres Heptapeptid (WHWTYYW), das die kristallinen Regionen von Cellulose bindet, indem sie Cellulose-Nanowhisker als Substrat beim Phagen-Display einsetzten. Die Bindungseigenschaften dieses Peptids zur Cellulose wurden vielfältig mittels Phagen-ELISA, isothermer Titrationskalorimetrie, Spektroskopie und computergestützter Molekülmodellierung analysiert. Dabei zeigte sich, dass aromatische und van-der-Waals-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einzelnen Aminosäuren und der Cellulose für die Haftung zum Substrat verantwortlich sind.<sup>[190]</sup>

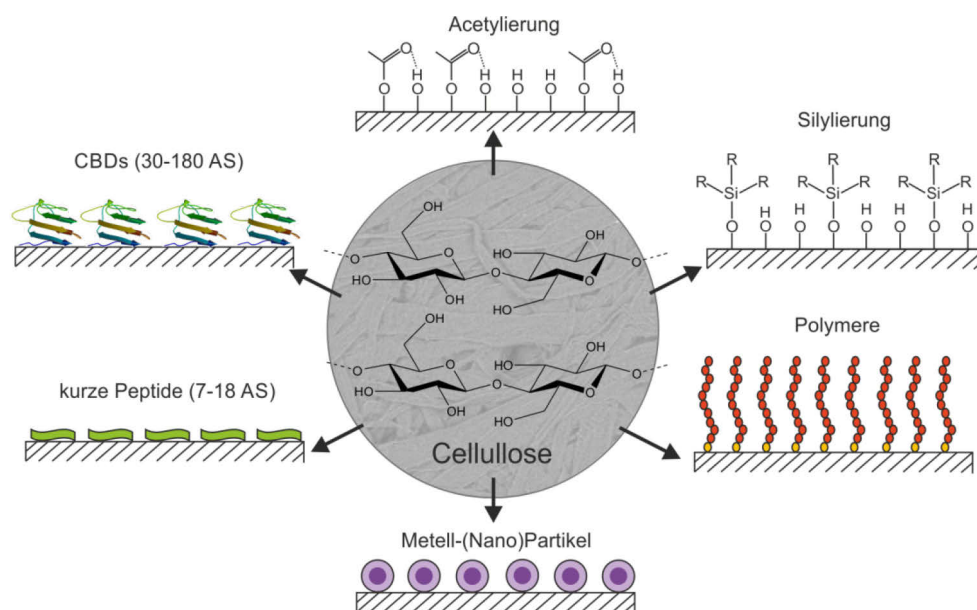
**Tabelle 2.2.** Mittels Phagen-Display identifizierte, literaturbekannte Bindungssequenzen für Cellulose: ausführlicher untersuchte Bindungssequenzen sind fett hervorgehoben; WSB: Wasserstoffbrückenbindung, Ww.: Wechselwirkung, TUP: unspezifische Bindungssequenz (*target unrelated peptide*).

selektierte Cellulose Bindungssequenzen	Postulierte Ww. & Bemerkungen	Cellulose Substrat	Literatur
SHTLSAK, TQMTSPR, YAGPYQH	WSB		
GQTRAPL, QLKTGPA, FQVPRSQ, LRLPPAP, LPSQTAP	hydrophobe Ww.	mikrokristallin (Avicel®)	[171]
HAIYPRH	bekanntes TUP		
VPRVTSI, MANHNLS, KCCYVNVGVSFVS, <b>THKTSTQRLAA</b> *)	hydrophile Ww. *)K <sup>3</sup> , Q <sup>7</sup> , R <sup>8</sup> , L <sup>9</sup> , L <sup>10</sup> laut Ala-Scan wichtig	lange Fasern	[189]
<b>WHWTTYW</b> , WHWRAWY	aromatische Ww., van-der-Waals-Ww., WSB	Nanowhisker	[190]

Neben diesen Funktionalisierungsmöglichkeiten der Cellulose über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit Biomolekülen gibt es natürlich auch zahlreiche Wege, gewünschte Eigenschaften der Cellulose über die kovalente Anbindung neuer Funktionalitäten zu steuern.<sup>[192]</sup> Dies geschieht meist durch Reaktionen an den Hydroxylgruppen.<sup>[154, 155, 170]</sup> So kann bspw. Cellulose, die über Cellulosesotylat als Zwischenstufe mit Nitrilotriessigsäure (NTA) modifiziert wurde, Nickel(II)-Ionen komplexieren und dünne, durchsichtige Filme auf Glas ausbilden. Diese Filme können zur Aufreinigung oder Detektion von Proteinen über ein Polyhistidin-Tag (His-Tag) eingesetzt werden.<sup>[193]</sup> C. BARNER-KOWOLLIK, H. G. BÖRNER *et al.* nutzten in einem *grafting-onto*-Ansatz Hetero-Diels-Alder-Cycloadditionen, um Thioamid-funktionalisierte Oligopeptide als Dienophile kovalent an Cyclopentadienyl-funktionalisierte Celluloseoberflächen (Dien) zu binden.<sup>[194]</sup> Die mechanischen Eigenschaften der Cellulose können bspw. verbessert werden, indem Übergangsmetallverbindungen wie Diethylzink mittels Gasphasenabscheidung in das Cellulosegerüst eingebaut werden.<sup>[195]</sup> In einem anderen Ansatz entstanden durch Gasphasenpolymerisation von Pyrrol an Cellulosefasern elektronisch leitfähige Textilien.<sup>[196, 197]</sup> Außerdem konnten flexible Biokomposite aus Nanocellulose, Polypyrrol und Silber Nanopartikeln durch oxidative Polymerisation hergestellt werden. Diese wiesen nicht nur elektrisch leitende sondern auch antibakterielle Eigenschaften auf.<sup>[198]</sup> Es wird weiterhin daran gearbeitet, elektrisch leitfähige Cellulose, die durch Funktionalisierung mit leitenden Polymeren

und/oder Metallpartikeln hergestellt wurde, in flexiblen, wieder aufladbaren lithiumbasierten Akkumulatoren einzusetzen.<sup>[25]</sup>

Für zahlreiche Anwendungen wird eine hydrophobe Oberfläche benötigt, damit die eigentlich hydrophilen Cellulosefasern in häufig verwendeten hydrophoben Medien nicht agglomerieren. Dafür können die Hydroxylgruppen an der Oberfläche z. B. acetyliert oder silyliert werden.<sup>[47, 162, 165]</sup> Celluloseoberflächen können auch durch das Aufpfropfen von Polymeren umgestaltet werden, um sie stabiler gegenüber Wasser- oder Öleinwirkung, Hitze, Verschleiß oder auch mechanischer Beanspruchung zu machen. Dadurch entstehen maßgeschneiderte Materialien, die bspw. zur Adsorption toxischer Stoffe aus Abwässern oder als antibakterielle Materialien eingesetzt werden.<sup>[47, 170, 199-201]</sup> Es ist außerdem möglich, hydrophile cellulosebasierte Materialien in superhydrophobe Stoffe mit selbst-reinigenden Eigenschaften umzuwandeln,<sup>[170, 199, 202]</sup> indem die benötigten Eigenschaften (nanoskalierte Rauheit und geringe Oberflächenenergie) bspw. durch plasmagestützte Prozesse generiert werden<sup>[203]</sup> oder Trichlormethylsilan durch chemische Gasphasenabscheidung aufgetragen wird<sup>[204]</sup>.



**Abbildung 2.8.** Schematische Darstellung einiger vorgestellter Beispiele zur Funktionalisierung von Celluloseoberflächen; für manche Anwendungen werden unter Umständen auch mehrere dieser kombiniert.

Abbildung 2.8 zeigt schematisch eine Zusammenfassung wichtiger vorgestellter Möglichkeiten, Celluloseoberflächen zu funktionalisieren. All diese Beispiele geben einen Einblick in die umfangreiche Welt der Cellulosechemie und verdeutlichen auch das Potential und das große Interesse der Wissenschaft an diesem nachwachsenden Rohstoff. Da Papier das am weitesten verbreitete cellulosebasierte Material darstellt, wird auf dessen Funktionalisierung im folgenden Kapitel zusätzlich näher eingegangen.

### 2.4.3 Funktionalisierung von Papier

Papier entwickelt sich als preiswertes, natürliches und wiederverwertbares Material ebenso wie die reine Cellulose zunehmend zur Basis für unterschiedlichste Forschungszweige und Anwendungen. Die Funktionalisierungsmöglichkeiten sind ebenso umfangreich wie an reiner Cellulose und mögliche Anwendungen liegen vor allem im Bereich der Diagnostik und der Sensorik.<sup>[170, 205, 206]</sup> Einige ausgewählte Beispiele sollen hier kurz vorgestellt werden, um einen Überblick über funktionale papierbasierte Materialien zu geben.

Um gewünschte Funktionalitäten in definierten Mustern auf Papieroberflächen anzuordnen werden prinzipiell ähnliche Techniken genutzt, wie sie in Abschnitt 2.2.3 allgemein erklärt wurden. Häufig werden chemische Funktionalisierungsmöglichkeiten eingesetzt, die unter anderem photokatalytisch oder photochemisch gesteuert werden können.<sup>[207-209]</sup> Zahlreiche Anwendungen erfordern eine gewisse Stabilität gegenüber Wasser, weshalb es viele Bemühungen gibt, Papier hydrophober zu gestalten. Dafür kann die Oberfläche bspw. mittels Plasmaabscheidung mit Hexamethyldisilazan funktionalisiert werden, wodurch im Gegensatz zur sonst üblichen Beschichtung mit Polymeren die ursprüngliche Porosität des Papiers beibehalten wird.<sup>[210]</sup>

Ein Gebiet, in dem Papier immer häufiger die klassischen Plattformen wie Glas oder Polymere wie PDMS ersetzt, ist die Mikrofluidik. Solche  $\mu$ PADs können bspw. photolithographisch<sup>[208, 211]</sup> oder mit bekannten Leimungsmitteln aus der Papierindustrie hergestellt werden<sup>[212]</sup>. Das Grundprinzip ist dabei folgendes: es werden hydrophobe Barrieren (durch Photolack, Leimungsmittel, Polymere oder Wachs) in Mustern auf das Papier aufgetragen, wodurch zwischen diesen Barrieren hydrophile Kanäle entstehen, die einen Flüssigkeitstransport in gesteuerten Bahnen erlauben. Auf diese Weise können unter anderem papierbasierte Mikrotiterplatten oder sogar 3D  $\mu$ PADs hergestellt werden.<sup>[213]</sup> Letztere wurden bereits aus handelsüblichen Haushaltsmaterialien wie Papier und beidseitigem Klebeband produziert. Dafür wurde das hydrophile Papier stellenweise mit einem hydrophoben Photolack gemustert, mit hydrophobem durchlöcherter Klebeband beschichtet und anschließend wurden diese Löcher mit feinem Cellulosepulver aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, zwischen den einzelnen hydrophilen Celluloseschichten entstehen somit Kanäle, die über die mit Cellulose gefüllten Löcher miteinander verbunden sind.<sup>[211]</sup> Die Flussrate in  $\mu$ PADs kann über bestimmte Wege und Muster oder direkte Ventile gesteuert werden.<sup>[214]</sup>

Auch durch den Einsatz herkömmlicher Drucker wurde Papier bereits funktionalisiert, um kostengünstig  $\mu$ PADs zu realisieren.<sup>[82, 205, 212, 215]</sup> Ein Beispiel hierfür ist der Wachsdruck. Dafür

werden Muster aus einer hydrophoben Wachstinte (eine Mischung aus hydrophoben Carbamaten, Kohlenwasserstoffen und Farbstoffen) auf Papier gedruckt, welche anschließend aufgeschmolzen wird und das Papier an diesen Stellen in der gesamten Tiefe durchdringt. Dadurch entstehen auch hier hydrophobe Barrieren und dazwischen hydrophile Kanäle, Flüssigkeitsreservoirs und Reaktionszonen.<sup>[215, 216]</sup> Potentielle Anwendungen der  $\mu$ PADs liegen vor allem in den Bereichen der Diagnostik und Sensorik, wo ihre Herstellung und Nutzung der breiten Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden sollen. Häufig werden sie auch für Anwendungen in Entwicklungsländern und Feldanalysen vorgeschlagen.

Selbst zur medizinischen Forschung wurden papierbasierte Systeme wie Biosensoren entwickelt, deren kommerzielle Herstellung aber meist noch aussteht.<sup>[206, 217]</sup> So wurde bspw. ein System zur elektrochemischen Analyse der Glucosekonzentration in Urin durch Fließinjektion vorgestellt.<sup>[218]</sup> Weiterhin entwickelten M. MEYYAPPAN *et al.* bzw. S. H. LEE, B. D. MALHOTRA *et al.* papierbasierte Biosensoren für die DNA- und Tumormarker-Detektion.<sup>[219, 220]</sup> G. M. WHITESIDES *et al.* stellten eine Methode vor, 3D Modelle von Zellkulturen zu realisieren, indem mehrere Lagen teilhydrophobierten Papiers übereinander geschichtet wurden, das in den hydrophilen Bereichen mit einer Suspension aus lebenden Zellen in einem Hydrogel einer extrazellulären Matrix imprägniert war.<sup>[221, 222]</sup> Ein Ansatz zur Herstellung bioaktiven Papiers kann die Benetzung durch Bakteriophagen sein, die in der Lage sind bestimmte Bakterien zu lysieren.<sup>[223, 224]</sup> Diese können bspw. über CBDs an die Cellulosefasern gebunden werden.<sup>[223]</sup>

Auch die Herstellung papierbasierter Elektronik wurde untersucht und von verschiedenen Arbeitsgruppen vorangetrieben. So wurden bspw. papierbasierte kapazitive Touchpads,<sup>[225]</sup> Elektroden<sup>[226, 227]</sup> und flexible Photodetektoren<sup>[228]</sup> hergestellt. Auch ein Feuchtigkeitssensor auf der Basis von Kohlenstoffnanoröhren<sup>[229]</sup> und mit Polypyrrol beschichtetes Kompositpapier zur Detektion von Metallionen<sup>[230]</sup> wurden entwickelt. Es wird auch über Elektroden für Batterien aus karbonisiertem Filterpapier, das mit Zinn-Kohlenstoff-Nanopartikeln funktionalisiert wurde, diskutiert.<sup>[227]</sup> Weiterhin wurden elektrische Schaltkreise realisiert, indem Papier in metallisch leitenden Mustern funktionalisiert wurde, z. B. durch Sputtern oder Gasphasenabscheidung von Zinn oder Zink. Auf diese können mittels eines leitenden Epoxids einzelnen elektronischen Komponenten, wie LEDs, Widerstände oder Batterien aufgebracht werden, wodurch flexible und kostengünstige elektronische Schaltkreise auf Papier hergestellt werden konnten.<sup>[231]</sup>

#### 2.4.4 Zusammensetzung und Aufbau von Toner

Als Toner wird das Farbpulver bezeichnet, das in Kopier- und Faxgeräten sowie Laserdruckern eingesetzt wird, die auf dem Prinzip der Elektrofotografie beruhen. Es handelt sich dabei um ein



sehr feines Pulver aus meist monodispersen Partikeln im Größenbereich von 5  $\mu\text{m}$  bis 25  $\mu\text{m}$ , das aufgrund der geringen Größe der einzelnen Partikel fließfähig ist. Im Gegensatz dazu sind Tinten, die für andere Druckverfahren genutzt werden, als Lösungen oder Suspensionen von Pigmenten und Additiven definiert. Die erreichbare Auflösung und Bildqualität beim Drucken sind dabei unter anderem abhängig von der Größe und Größenverteilung der einzelnen Tonerpartikel. Daher wird Toner heutzutage meist mittels Suspensions- oder Emulsionspolymerisation, anstatt wie früher üblich durch Mahlprozesse, hergestellt. Dadurch entstehen einheitlich sphärische, monodisperse Partikel.<sup>[232-235]</sup> Der Toner besteht üblicherweise aus einem Polymer als Hauptbestandteil, Farbpigmenten, Stoffen zur magnetischen oder elektrostatischen Ladungskontrolle und -stabilisierung (z. B. quaternäre Ammoniumsalze), Fließmitteln wie Siliziumdioxid, Aluminium- oder Titanoxid und anderen Additiven. Das Polymerharz dient dabei als Trägermaterial und sorgt dafür, dass der Toner auf dem Druckmedium fixiert werden kann. Dies geschieht durch kurzes Aufschmelzen in der Fixiereinheit des Druckers. Meist wird dabei auch Druck auf den Toner ausgeübt. Als Polymerharze werden entweder Polyester oder Copolymere aus Styrol und Butylacrylat eingesetzt.<sup>[236]</sup> Diese besitzen eine Glasübergangstemperatur, die üblicherweise im Bereich von 60 °C bis 80 °C liegt. Da die Druckqualität in hohem Maße von der Zusammensetzung des jeweiligen Toners abhängig ist, halten viele Firmen die einzelnen Inhaltsstoffe ihres Toners und deren genaue Zusammensetzung unter Verschluss.

#### **2.4.5 Funktionalisierung von Tinten und Toner**

Es existiert nur wenig Literatur über Möglichkeiten, bestimmte Tinten oder Toner bzw. Polymeren aus denen der Toner zum Großteil besteht zu funktionalisieren. Dies mag unter anderem daran liegen, dass die Oberfläche konventioneller Toner aus Polyestern oder Copolymeren aus Styrol und Acrylat relativ inert ist und eine kovalente Funktionalisierung bei weitem nicht so leicht zugänglich ist wie bei Cellulose. Dennoch sollen einige Beispiele hier kurz vorgestellt werden.

Einen interessanten Ansatz zur Funktionalisierung einzelner Tonerpartikel stellten A. WEBER *et al.* vor, um dreidimensionale Objekte daraus aufbauen zu können (*rapid prototyping*). Dafür wurde die Oberfläche von Polyacrylatpartikeln über die Kupplung eines reaktiven Aminderivates mit komplementären Reaktivgruppen zur Anbindung verschiedener Klick-Funktionen funktionalisiert (Thiol, Alkin, Dien, Azid). Anschließend können die Partikel durch die Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen den unterschiedlichen Funktionalisierungen mittels Klick-Chemie aufeinander fixiert werden.<sup>[237, 238]</sup>

Auch zum Phagen-Display an Druckertinte oder Toner gibt es nur wenige bekannte Studien.<sup>[189, 239]</sup> Die Arbeit von J. YANG *et al.*, in der ein Dispersions- und Bindemittel für Druckertinte mit einer pigmentbindenden Peptidsequenz gefunden wurde (das rußbindende Heptapeptid FHENWPS), ist bereits in Abschnitt 2.4.2 vorgestellt worden.<sup>[189]</sup> Einen anderen Ansatz verfolgte die Arbeitsgruppe um M. C. MCALPINE, als sie mittels Phagen-Display Peptide identifizierten, die an Trimethoxy(octyl)silan als molekulare Tinte adsorbieren. Diese wurde zuvor mittels Photolithographie oder Mikrokontaktdruck auf Siliziumsubstraten aufgedruckt. Das sehr hydrophobe Peptid SILPYPY wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt und zeigte eine gute Spezifität zur verwendeten Tinte gegenüber dem Si-Substrat.<sup>[239]</sup>

Einige Studien zu polymerbindenden Peptiden, die mittels Phagen-Display identifiziert wurden, fanden bereits in Abschnitt 2.3.2 Erwähnung. Es wurden mehrfach Peptide identifiziert, die Poly(styrol) (PS) binden (vgl. Tabelle 2.3), aber es sind zurzeit keine Studien über Peptide bekannt, die in der Lage sind, Copolymere aus Styrol und Butylacrylat oder nur Poly(butylacrylat) zu binden. Entscheidend für Wechselwirkungen zwischen PS und den zahlreich selektierten Peptiden sind vor allem aromatische, basische und aliphatische AS. Dabei scheinen His und Trp eine herausragende Rolle zu spielen.<sup>[111, 240-244]</sup>

**Tabelle 2.3.** Mittels Peptidbibliotheken identifizierte literaturbekannte Bindungssequenzen für Poly(styrol) (PS); TUP – unspezifisches Peptid (*target unrelated peptide*), ELISA - *enzyme linked immunosorbent assay*.

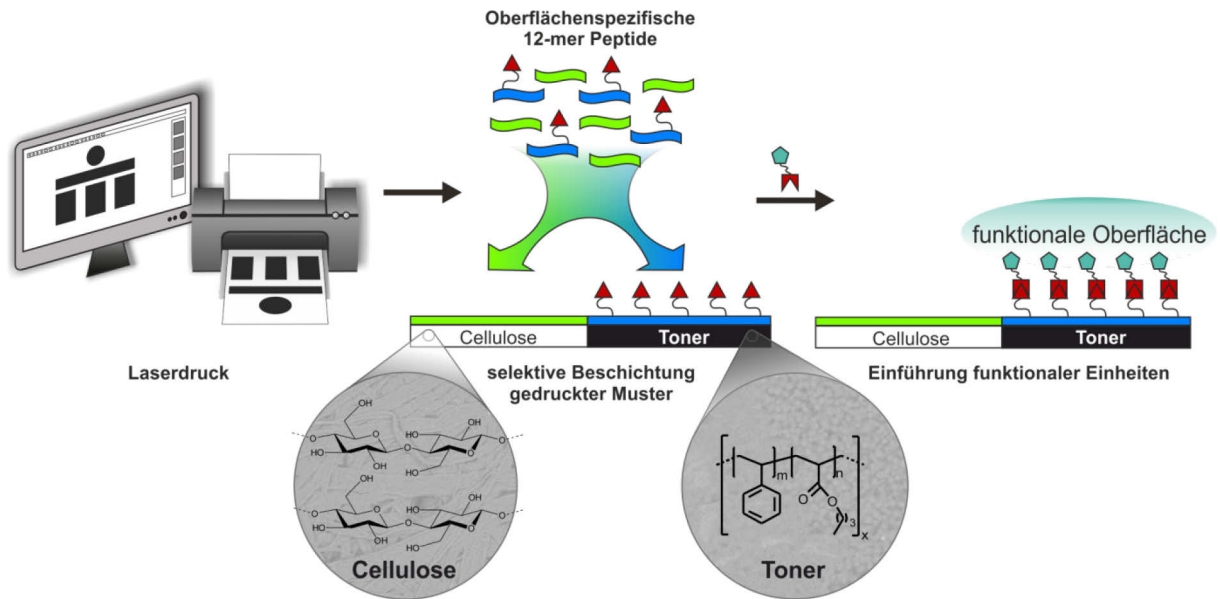
selektierte PS Bindungssequenzen	Postulierte Wechselwirkungen	Bemerkungen & Analysemethoden	Literatur
FSWEAFA, HLESTPG, GETRAPL	aliphatisch & aromatisch	spezifische Sequenzen für syndiotaktisches PS; Phagen-ELISA	[111]
RAFIASRRIRKP, AGLRLKKAIIHR	aliphatisch & basisch	<i>E.coli</i> Bibliothek; ELISA (gekuppelt an Glutathio-S-Transferase);	[240]
FKFWLYEHVIRG	aromatisch & basisch	ELISA	[241]
HWGMWSY	-	PS-bindendes TUP aus verschiedenen nicht PS-bezogenen Studien; ELISA & Elutionsassay	[243]
WHWNAPWWNGVY, FHWTWQFPYTST	aromatisch & basisch	PS-bindende TUPs; Phagen-ELISA & Elutionstitration	[244]

### 3 ZIELSTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Herstellung kostengünstiger, funktionaler Materialien für die Sensorik bzw. Diagnostik. Es sollte ein neuer und leicht zugänglicher Weg zur Funktionalisierung gedruckter Muster auf Papier realisiert werden, der ein breites Spektrum zur Herstellung funktionaler Materialien ermöglichen kann.

Dazu sollten kurze Peptid-Bindungsdomänen identifiziert werden, die in der Lage sind, auf Papier gedruckte Muster selektiv zu funktionalisieren. Hierfür werden Peptidsequenzen mit unterschiedlichen Eigenschaften benötigt, die jeweils an eines von zwei Substraten kreuzspezifisch binden, ohne nennenswerte Affinität zu dem jeweiligen Anti-Substrat aufzuweisen. Es werden ein Toner-bindendes Peptid, welches am gedruckten Muster adsorbiert, und ein Cellulose-bindendes Peptid, welches an den Cellulosefasern als Hauptbestandteil des unbedruckten Papiers adsorbiert, benötigt. Mittels Phagen-Display sollten solche kreuzspezifischen Bindungssequenzen identifiziert werden. Deren Adsorptionsverhalten zu beiden Substraten sollte ausführlich untersucht werden, um ein gutes Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Peptid und Substratoberfläche zu erlangen.

Mit Hilfe der gefundenen kreuzspezifischen Bindungssequenzen sollte anschließend die Funktionalisierung gedruckter Muster auf Papier realisiert werden. Dazu müssen die Parameter der Funktionalisierung dieser komplexen Oberfläche entsprechend optimiert werden. Weiterhin sollten Strategien zur Anbindung funktionaler Gruppen an eines der Peptide entwickelt werden. Als Beispiel dafür sollten durch nachträgliche Funktionalisierung der Toneroberfläche weitere funktionale Einheiten in das System eingebracht werden.



**Abbildung 3.1.** Schematische Darstellung zur Realisierung funktionaler gedruckter Muster über kreuzspezifische Peptidadsorption an Cellulose und Toner.

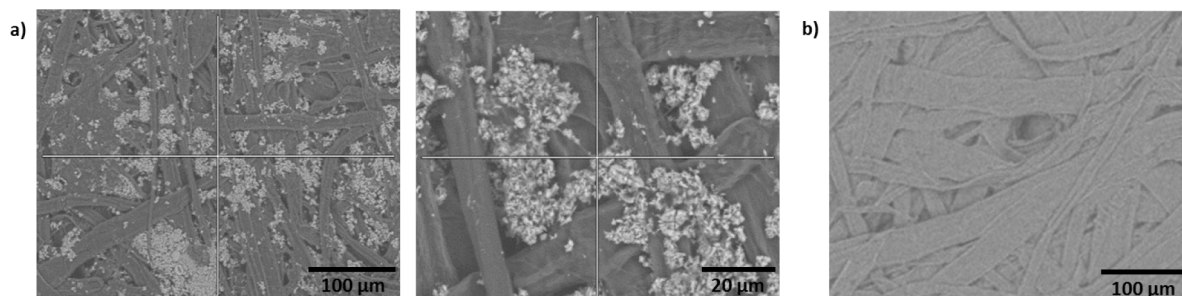
## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Analyse der Oberflächen

Um das verwendete System zu charakterisieren und zu verstehen werden im Folgenden erste Untersuchungen der eingesetzten Oberflächen vorgestellt. Unterschiedliche Analysemethoden wurden dabei angewandt, um deren Beschaffenheit und Eigenschaften zu analysieren und das für die spätere Funktionalisierung zu Grunde liegende System zu optimieren.

#### 4.1.1 Papier und Cellulose

Fast jedes handelsübliche Papier besteht hauptsächlich aus Cellulosefasern. Allerdings wird Druckerpapier wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben mit unterschiedlichen Füllmaterialien und Additiven behandelt, um Tinte oder Toner besser aufzunehmen, die Druckqualität zu erhöhen und das Gedruckte permanent zu erhalten. Diese Zusätze variieren von Papiersorte zu Papiersorte und führen nicht selten sogar dazu, dass die Oberfläche des Papiers im oberen  $\mu\text{m}$ - bis nm-Bereich nicht aus Cellulose besteht, sondern aus Leimungs- oder Imprägniermitteln. Abbildung 4.1 zeigt Rasterelektronenmikroskop-(REM)-Aufnahmen von herkömmlichem Druckerpapier bei zwei verschiedenen Auflösungen und im Vergleich eine Aufnahme von Filterpapier bestehend aus reiner Cellulose.



**Abbildung 4.1.** REM-Aufnahmen von a) herkömmlichem Druckerpapier bei 500- und 2000-facher Vergrößerung mit deutlich erkennbaren Füllstoffen und b) Filterpapier bei 500-facher Vergrößerung ohne sichtbare Füllstoffe.

Im Druckerpapier sind deutlich Füllstoffe zu erkennen, die sich in den Lücken zwischen den einzelnen Cellulosefasern eingelagert haben. Im Vergleich dazu weist das Filterpapier keine sichtbaren Zusätze auf. Weiterhin fallen beim größeren Filterpapier die größeren Cellulosefasern im Vergleich zum Druckerpapier auf. Auch ein Vergleich der chemischen Zusammensetzung der beiden unterschiedlichen Papiersorten zeigt deutliche Unterschiede. Tabelle 4.1 fasst die Ergebnisse von energiedispersiven röntgenspektroskopischen Untersuchungen (EDX) an beiden

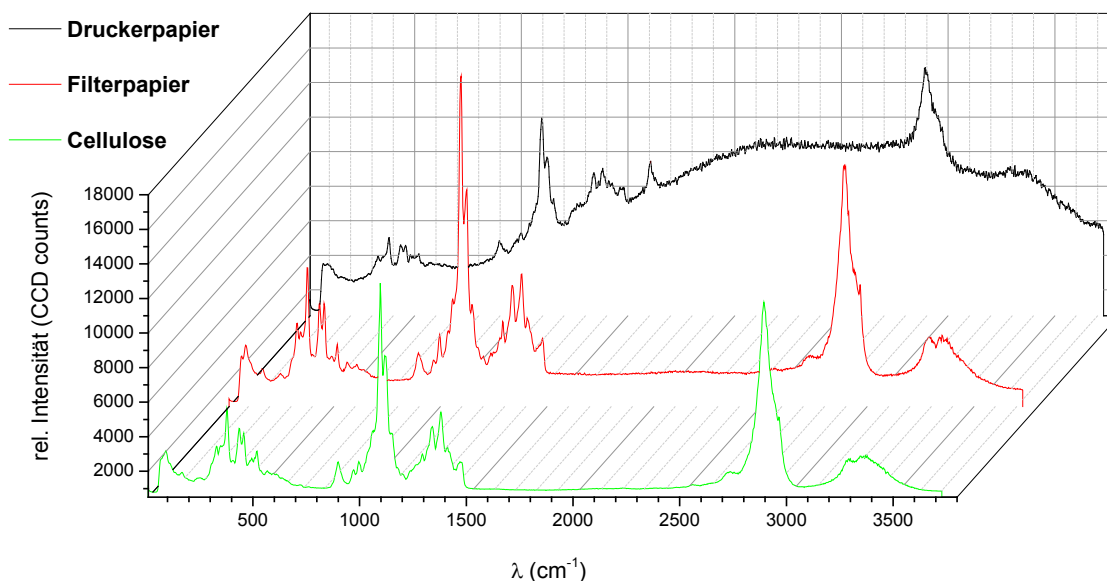
Papiersorten zusammen (für ausführliche Ergebnisse siehe Tabelle 6.6) und zeigt die Zusammensetzung beider Proben aus den Elementen Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Calcium und Silizium.

**Tabelle 4.1.** EDX-Ergebnisse zur elementaren Zusammensetzung von handelsüblichem Druckerpapier im Vergleich zu Filterpapier; angegebene Werte sind Durchschnittswerte aus drei Messungen.

Atom-%	C	O	N	Ca	Si
<b>Druckerpapier</b>	44,8 ± 3,6	41,5 ± 4,5	1,7 ± 1,4	8,2 ± 0,4	3,7 ± 0,3
<b>Filterpapier</b>	55,2 ± 12,8	38,3 ± 13,4	4,0 ± 7,8	1,6 ± 0,5	0,7 ± 0,2

Dabei ist deutlich zu erkennen, dass das Druckerpapier mehr Calcium und Silizium enthält als das Filterpapier. Dies weist auf Füllstoffe wie  $\text{CaCO}_3$  oder  $\text{SiO}_2$  hin, die häufig eingesetzt werden, um das Papier besser bedruckbar zu machen.<sup>[245]</sup>

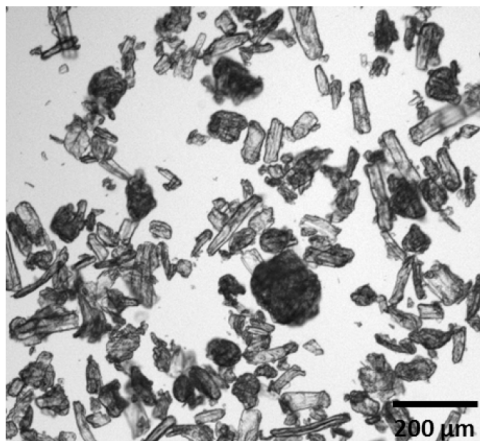
Auch ein Vergleich der Raman-Spektren von Druckerpapier und reiner kristalliner Cellulose zeigt Unterschiede. Im Gegensatz dazu sind die Spektren von Filterpapier und der reinen Cellulose nahezu identisch. In Abbildung 4.2 sind diese Spektren gegenüber gestellt. Im Vergleich von kristalliner Cellulose und Filterpapier mit dem Druckerpapier ist bei letzterem ein deutliches Untergrundrauschen festzustellen. Dieses kann z. B. auf geringe Mengen optischer Aufheller zurück zu führen sein, welche die Raman-Streuung durch Fluoreszenz überlagern. Weiterhin tritt bei  $1604\text{ cm}^{-1}$  eine Bande auf, die nicht zur kristallinen Cellulose zuzuordnen ist. Diese kann spezifisch für holzhaltiges Papier sein und ist vermutlich auf Reste von Lignin zurückzuführen, einem komplexen Biopolymer aus verschiedenen Phenylpropanoiden mit C=C- und C=O-Valenzschwingungen in diesem Bereich.<sup>[246]</sup>



**Abbildung 4.2.** Gegenüberstellung der Raman-Spektren von kommerziellem Druckerpapier (schwarz), Filterpapier (rot) und kristalliner Cellulose (grün).

All diese Untersuchungen verdeutlichen, dass kommerzielles Druckerpapier ein sehr komplexes Mehrkomponentensystem darstellt, wohingegen einfaches Filterpapier aus reiner Cellulose besteht und eindeutiger zu charakterisieren ist. Daher wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit dichtet, langsam filtrierendes Filterpapier, statt des komplexen Druckerpapiers, verwendet. Dies soll sicherstellen, dass keine Füllstoffe oder Beschichtungen die Wechselwirkungen zwischen den selektierten Peptiden und den Cellulosefasern stören. Kontrollversuche mit kommerziellem Druckerpapier mittels bildgebender MALDI-Untersuchungen bestätigten die Notwendigkeit hierfür (siehe Kapitel 4.4.1, Abbildung 4.20). Das verwendete Filterpapier vom Typ MN 640 D zeichnet sich durch einen  $\alpha$ -Cellulosegehalt von  $> 95 \%$ , einem Flächengewicht von  $85 \text{ g/m}^2$  und einen Rückhaltebereich von  $> 2 \mu\text{m}$  aus.  $\text{N}_2$ -Adsorptions-Messungen ergaben nach dem BET-Modell eine spezifische Oberfläche von  $0,84 \pm 0,01 \text{ m}^2/\text{g}$  (vgl. Tabelle 6.7). Mithilfe dieser können in späteren Adsorptionsuntersuchungen die Peptidkonzentrationen an verschiedenen Substraten in ein besseres Verhältnis gesetzt werden.

Für erste systematische Untersuchungen und auch für das Phagen-Display Screening wurde allerdings reine Cellulose in Form von mikrokristallinem Pulver eingesetzt, da diese chemisch identisch zum Filterpapier (vgl. Abbildung 4.2), einfacher zu handhaben und zu analysieren ist. Das Cellulosepulver besteht aus kristalliner Cellulose mit einzelnen Partikeln im Größenbereich von ca.  $10 \mu\text{m}$  bis zu  $200 \mu\text{m}$ . Abbildung 4.3 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme des Pulvers.  $\text{N}_2$ -Adsorptions-Messungen an diesem ergaben nach dem BET-Modell eine spezifische Oberfläche von  $1,06 \pm 0,01 \text{ m}^2/\text{g}$  (vgl. Tabelle 6.7).



**Abbildung 4.3.** Lichtmikroskopische Aufnahme des Cellulosepulvers mit unterschiedlich großen Cellulosepartikeln.

#### 4.1.2 Toner

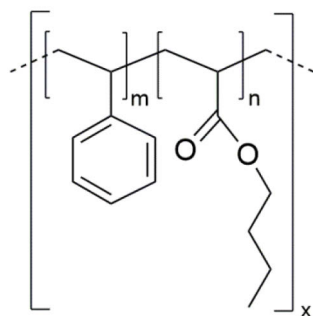
Für die vorliegende Arbeit wurde, wenn nicht anders beschrieben, ein handelsüblicher BROTHER HL-5350DN Schwarz-Weiß-Laserdrucker verwendet. Der zugehörige Toner ist als TN-3200 gekennzeichnet und setzt sich laut Hersteller aus den in Tabelle 4.2 genannten Bestandteilen zusammen.<sup>[247]</sup>

**Tabelle 4.2.** Zusammensetzung des für die Arbeit verwendeten Toners TN-3200.

Komponente	CAS Nummer	Gewichts-%
Styrol-Butylacrylat-Copolymer	25767-47-9	84 - 87
Kohlenschwarz (gebunden)	1333-86-4	5 - 7
Fettsäureester	registriert	4 - 5
Poly(methylmethacrylat)	9011-14-7	1 - 3
Styrol-Acryl Harz	registriert	1 - 2
Siliziumdioxid (amorph)	844491-94-7	< 1
Siliziumdioxid (amorph)	7631-86-9	< 1

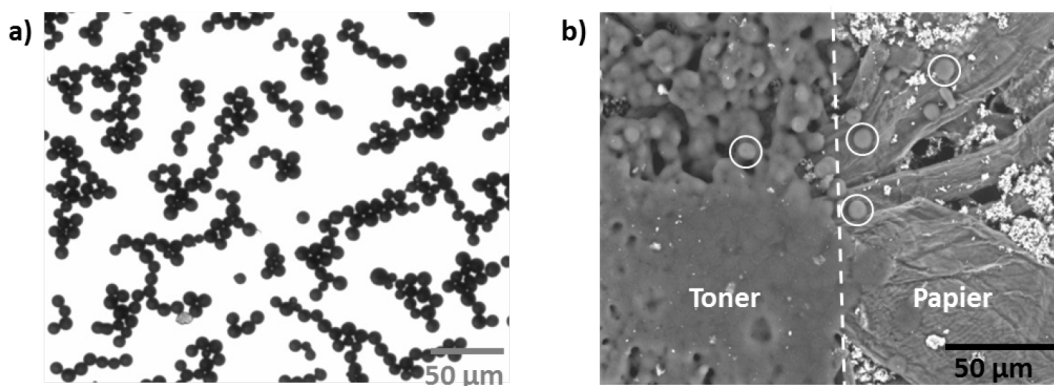
Der Hauptbestandteil ist ein Copolymer aus Styrol und Butylacrylat, für das in Abbildung 4.4 eine verallgemeinerte Formel dargestellt ist. Weiterhin sind Kohlen schwarz (Ruß) als Pigment und weitere Hilfsstoffe wie amorphes Siliziumdioxid als Trenn- und Fließmittel enthalten.





**Abbildung 4.4.** Verallgemeinerte Formel eines Poly(styrol-*co*-butylacrylats).

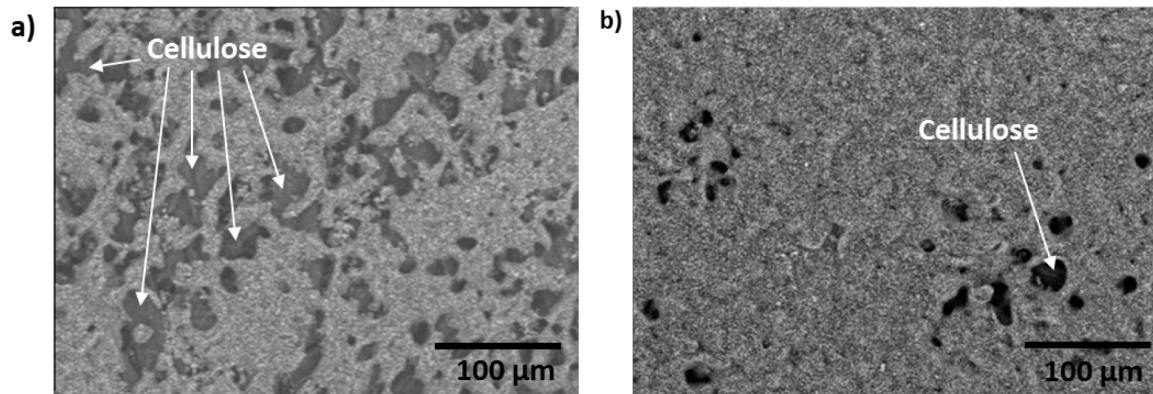
Diese Zusammensetzung erschwerte das Arbeiten in rein wässriger Suspension teilweise, da aufgrund dieser einzelnen hydrophoben Bestandteile (Styrol, Butylacrylat, Ruß, Siliziumdioxid) auch der gesamten Toner sehr hydrophob ist. Der unbehandelte Toner besteht aus monodispersen Polymerkugeln mit einer Größe von ca. 5 µm bis 10 µm. Abbildung 4.5 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme dieser Tonerpartikel und eine REM-Aufnahme von teilweise bedrucktem Druckerpapier.



**Abbildung 4.5.** Mikroskopische Aufnahmen des verwendeten Toners: a) lichtmikroskopische Aufnahme monodisperser Tonerpartikel vor dem Drucken, b) REM-Aufnahme von bedrucktem Druckerpapier: Toner—und Papierbereich sind entsprechend gekennzeichnet und die Grenze wird durch die weiß gestrichelte Linie hervorgehoben, teilweise sind nach einfachem Bedrucken noch einzelne Tonerpartikel erkennbar (durch weiße Umrandung hervorgehoben).

In der REM-Aufnahme ist deutlich zu erkennen, dass der Toner während des Druckvorgangs im Fixierschritt durch Wärmezufuhr und Druck größtenteils flächenhaft auf dem Papier fixiert wurde. Teilweise sind aber noch einzelne Tonerpartikel zu erkennen. Ebenfalls fällt auf, dass die bedruckte Fläche nicht deckend ist und die darunterliegenden Füllstoffe und Cellulosefasern an einigen Stellen noch erkennbar sind. Dies wird in Abbildung 4.6 (a) bei geringerer Vergrößerung zusätzlich verdeutlicht. Darin ist eine bedruckte Fläche dargestellt, bei der teilweise sehr deutlich noch die darunter liegenden Cellulosefasern erkennbar sind. Dies kann ein Problem darstellen, wenn gedruckte Muster später mit Peptiden funktionalisiert werden sollen. Denn so würde auf

dem gedruckten Muster zwar der Toner mit dem Toner-bindenden Peptid funktionalisiert werden, aber durch die Lücken würde auch das Cellulose-bindende Peptid an den darunter liegenden Cellulosefasern adsorbieren und die Beschichtungen dadurch weniger spezifisch erscheinen lassen.



**Abbildung 4.6.** REM-Aufnahmen einer gedruckten Tonerflächen auf Druckerpapier nach a) einmaligem Bedrucken (unter den Tonerflächen sind mehrfach Cellulosefasern zu erkennen) und b) dreimaligem Bedrucken (es sind nur noch vereinzelte, kleine Lücken in der Tonerfläche erkennbar).

Um dieses Problem zu reduzieren, wurden gedruckte Flächen zwei- oder dreimal nacheinander bedruckt. Dadurch wird lokal mehr Toner aufgetragen und dieser im Fixierschritt mehrfach aufgeschmolzen, wodurch eine geschlossene Toneroberfläche entsteht, wie sie in Abbildung 4.6 (b) gezeigt ist. Dies ist für die spätere Beschichtung mit den Peptiden von großer Bedeutung. Neben dieser Möglichkeit, die für mehrere cm<sup>2</sup> große Flächen und Muster sehr gut funktioniert, bietet sich in einem gewissen Rahmen für kleinere Muster im mm<sup>2</sup>-Bereich auch die Möglichkeit, mit den Druckeinstellungen eine gleichmäßigere Toneroberfläche zu generieren. Denn bei sehr feinen Mustern kann es durch den leicht variierenden Papiereinzug mitunter sehr schwer werden, bei mehrmaligem Drucken scharfe Grenzflächen zu erhalten. Dafür wurden bei sehr kleinen Mustern und einmaligem Druck Auflösung und Druckqualität jeweils möglichst hoch eingestellt, was ebenfalls zu befriedigenden Ergebnissen führte.

Für erste systematische Untersuchungen und das Phagen-Display Screening wurde auch hier anfangs nicht mit bedruckten Oberflächen, sondern mit reinem Toner gearbeitet. Um den Druckvorgang zu simulieren, wurden die monodispersen Tonerpartikel im Vorfeld zwischen zwei PET-Folien für 5 min auf 150 °C erhitzt. Dabei wurden die PET-Folien wiederum zwischen zwei dünne Stahlplatten gepresst, um Druck auszuüben und eine glatte Tonerfläche zu erhalten. Anschließend wurde diese durch Mörsern wieder zerkleinert, um polydisperse Tonerartikel im Größenbereich von ca. 0,1 mm bis 1 mm zu erhalten. Dies war für erste

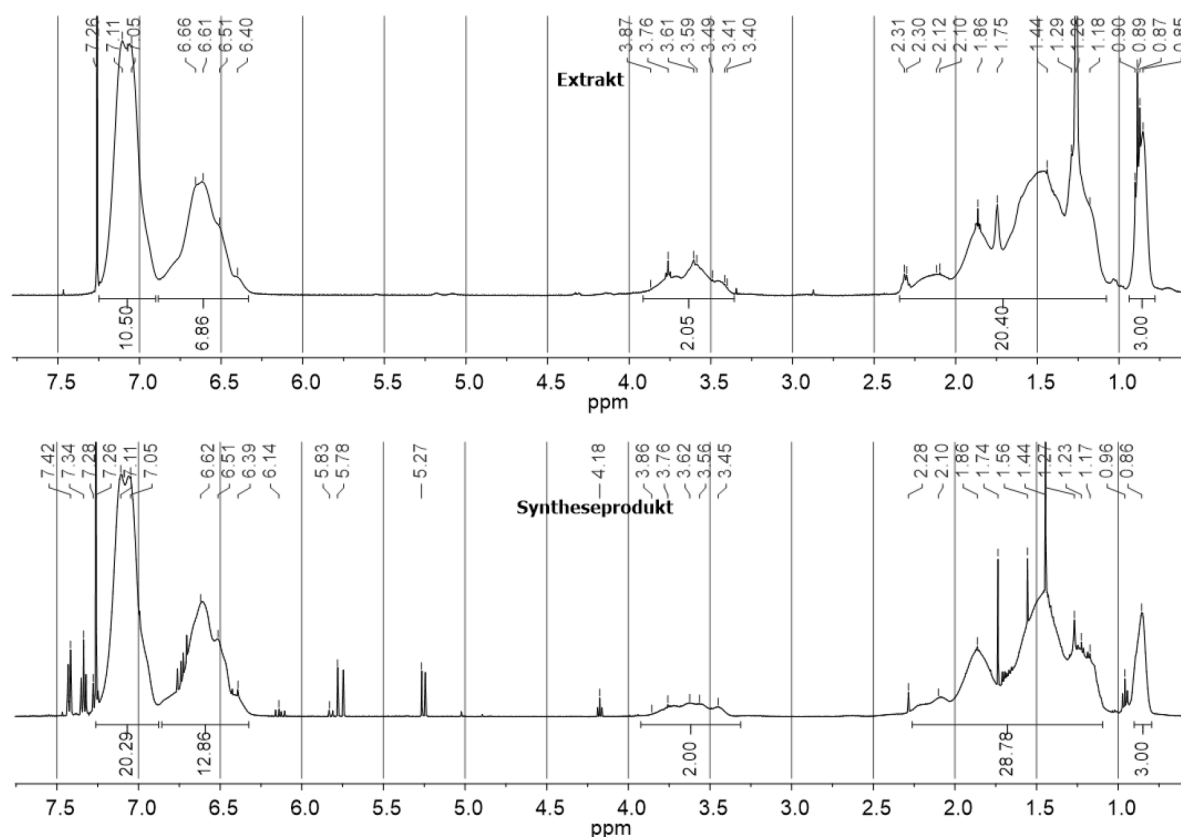
Adsorptionsuntersuchungen in Suspension zusätzlich von Vorteil. Denn dadurch ergab sich eine bessere Handhabung der Tonerpartikel, da die größeren Partikel beim Zentrifugieren schneller von der überstehenden Peptidlösung getrennt werden konnten.

Da die spezifische Oberfläche dieser Tonerpartikel zu gering ist, um durch N<sub>2</sub>-Adsorptionsmessungen nach der BET-Methode bestimmt zu werden, wurde sie stattdessen näherungsweise berechnet. Dafür wurde in einem Bildausschnitt einer Mikroskop-Aufnahme der durchschnittliche Durchmesser von 50 Partikeln ausgemessen. Daraus konnte anschließend die Oberflächen dieser Partikel berechnet werden (vgl. Tabelle 6.8). Es ergab sich eine spezifische Oberfläche von ca.  $0,06 \pm 0,02 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Für spätere Untersuchungen wurde zusätzlich das Copolymer als Hauptbestandteil des Toners mittels Extraktion in THF als farbloser Feststoff gewonnen. Die Verwendung des reinen Copolymers bietet den Vorteil, dass darin im Vergleich zum Toner keine weiteren Zusätze (Pigmente, anorganische Rückstände, etc.) mehr enthalten sind. Dadurch konnten zusätzliche Bindungsstudien durchgeführt werden (vgl. Kapitel 4.3.1.1). Weiterhin konnte ein analoges Copolymer aus Styrol und *n*-Butylacrylat auf synthetischem Wege hergestellt werden. Dazu wurden beide Monomere mittels radikalischer Polymerisation in einem Gemisch aus Methanol und *iso*-Propanol (9:1, v/v) mit 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) (AIBN) als Initiator analog zu einem Patent der Firma BROTHER umgesetzt.<sup>[248]</sup>

Abbildung 4.7 zeigt einen NMR-spektroskopischen Vergleich von extrahiertem und synthetisiertem Tonerpolymer. Daraus ist ersichtlich, dass die NMR-Spektren beider Copolymere die gleichen charakteristischen Verschiebungen aufweisen. In den Bereich 6,39 - 7,11 ppm bzw. 0,85 - 0,90 ppm sind die markanten chemischen Verschiebungen der aromatischen CH-Gruppen des Styrols bzw. der CH<sub>3</sub>-Gruppen des Acrylats zu erkennen. Weiterhin sind die Signale im Bereich 3,40 - 3,87 ppm der  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe des Acrylats und im Bereich 1,17 - 2,31 ppm den restlichen CH<sub>2</sub>- und CH-Gruppen zuzuordnen. Zusätzlich ist in beiden Spektren das Restprotonensignal des Lösungsmittels (CDCl<sub>3</sub>) bei 7,26 ppm zu sehen. Im Spektrum des Syntheseprodukts sind außerdem geringe Reste der Monomere zu sehen, dabei stammen die Peaks bei 0,96 ppm, 4,18 ppm, 5,83 ppm und 6,14 ppm vom Acrylatmonomer und bei 5,27 ppm, 5,78 ppm, 7,34 ppm und 7,42 ppm vom Styrolmonomer.

Zum Vergleich der Monomerverhältnisse fasst Tabelle 4.3 die Integrale der CH<sub>3</sub>-Gruppen des Acrylats und der aromatischen CH-Gruppen des Styrols aus diesen NMR-Spektren zusammen.



**Abbildung 4.7.** Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des aus dem Toner extrahierten (oben) und synthetisch hergestelltem (unten) Poly(styrol-*co*-butylacrylats).

**Tabelle 4.3.** Werte der Integrale über den Peaks markanter chemischer Verschiebungen der einzelnen Monomergruppen in den NMR-Spektren und daraus berechnete Monomerverhältnisse in der Zusammensetzung beider Copolymere.

	Extrakt	Syntheseprodukt
<b>Acrylat: <math>\text{CH}_3</math></b>	3,0	3,0
<b>Styrol: <math>\text{CH}_{\text{arom}}</math></b>	17,4	33,2
<b>Verhältnis Acrylat:Styrol</b>	1 : 3,5	1 : 6,6

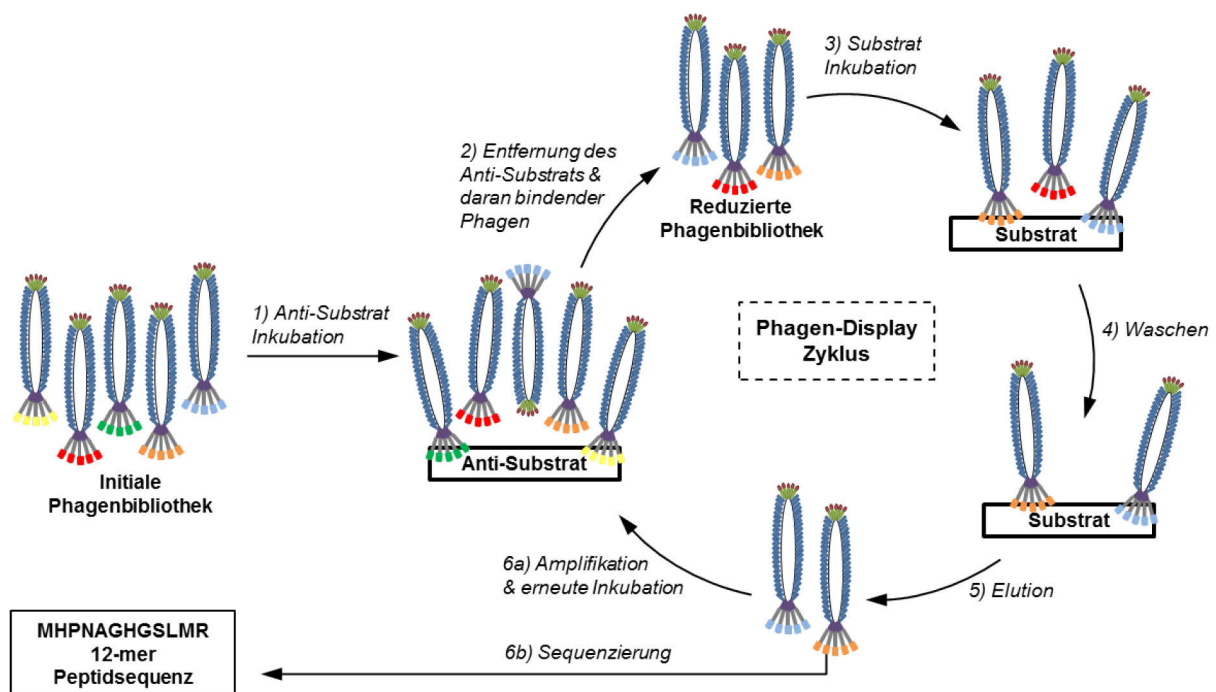
In der Tabelle zeigt sich zwar ein anderes Verhältnis beim Einbau beider Monomere in die Struktur des Copolymers, aber dennoch verdeutlichen die NMR-Spektren, dass Extrakt und Syntheseprodukt ähnlich aufgebaut sind und durchaus für vergleichende Bindungsstudien heran gezogen werden können.

## 4.2 Phagen-Display

Nachdem das System des bedruckten Papiers und die zugrundeliegenden Komponenten ausführlich vorgestellt wurden, werden im folgenden Kapitel die Ergebnisse des Phagen-Displays als Methode zur Selektion spezifisch an den Substratoberflächen bindender Peptide vorgestellt.

### 4.2.1 Durchführung und Optimierung des Screenings

Wie im vorherigen Kapitel erläutert wurden zur Selektion spezifisch bindender 12-mer Peptidsequenzen kristallines Cellulosepulver sowie aufgeschmolzene und wieder grob zerkleinerte Tonerpartikel als definierte Modellkomponenten verwendet. Um die Selektion von Peptidsequenzen zu forcieren, die spezifisch an nur einem der beiden Substrate binden, wurde das Standard Phagen-Display Protokoll um eine so genannte „Negativselektion“ erweitert. Dabei wird die Phagenbibliothek vor der Inkubation mit dem eigentlichen Substrat durch die Inkubation mit dem jeweils anderen Substrat (dem „Anti-Substrat“) dezimiert (vgl. Abbildung 4.8). Auf diese Weise soll die Wahrscheinlichkeit minimiert werden, dass am Ende Phagen selektiert werden, die eine starke Affinität zu beiden Substraten aufweisen.



**Abbildung 4.8.** Schematisch vereinfachte Darstellung eines Phagen-Display Zyklus mit Negativselektion: 1) Minimierung der initialen Phagenbibliothek durch Inkubation mit dem Anti-Substrat, 2) nach Entfernen des Anti-Substrats & daran bindender Phagen 3) Inkubation des Substrats mit reduzierter Bibliothek, gefolgt von 4) Waschschritten, 5) Elution stark bindender Phagen und 6a) Amplifizierung; durch wiederholtes Vorgehen entsteht eine zunehmend spezifischere Phagenbibliothek; nach mehreren Zyklen erfolgt die Analyse der bindenden Peptidsequenzen durch 6b) DNA-Sequenzierung der Phagenklone.

Anfangs wurde für beide Substrate ein Standard-Screening-Protokoll verwendet, das jeweils 30 min Inkubation des Anti-Substrats und des Substrats, verschiedene Waschschrte mit unterschiedlichen Puffern sowie die Elution der stark bindenden Phagen mittels Trypsin beinhaltet (vgl. Tabelle 4.5, Protokoll *CI* und *TI*). Es wurden jeweils vier Runden dieses Protokolls an beiden Substraten durchgeführt und jeweils zehn Phagenpopulationen aus der dritten und vierten Runde selektiert. Bei der Suche nach Bindungssequenzen für Cellulose führte dieses Standard-Protokoll zur Selektion 16 verschiedener Sequenzen. Von den 20 selektierten Cellulose-bindenden Phagen waren lediglich zwei ohne Insert, d. h. ohne künstlich insertierte randomisierte Peptidsequenz. Solche Phagen werden gelegentlich selektiert, da die Bibliothek zu einem geringen Anteil auch Phagen ohne Insert enthält, die über unspezifische Wechselwirkungen der Hüllproteine der Phagenklone mit der Substratoberfläche wechselwirken. Tabelle 4.4 zeigt eine Zusammenfassung der an Cellulose selektierten Sequenzen.

**Tabelle 4.4.** Zusammenfassung der 16 unterschiedlichen an Cellulose selektierten Peptidsequenzen aus der dritten und vierten Screening-Runde.

Sequenz	Häufigkeit	Screening Runde
QGGIPLSRTTFV	1	3
SLFGCSGICLKA	1	3
AAFPSLNLRTQP	1	3
KPGDTAMHYFPP	1	3
TSTNGKAAILVV	1	3
DRSHNFWFESGE	1	3
WDEQARTYPLRS	1	3
GDGNSVLKPGNW	1	3
GVILVLLGLCSF	1	4
SPVAVRSNVFVQ	1	4
KVPVGVLP LSHS	1	4
KASGSPSGFWPS	1	4
MPVKHMPKAHWI	1	4
DFSMDTHINYRR	1	4
TPQSFQKGS LV	1	4
MHPNAGHGSLMR	3	3, 4

Beim Phagen-Display Screening am Toner führte das oben beschriebene Standard-Protokoll zur Selektion von lediglich drei unterschiedlichen Peptidsequenzen. Allerdings war hier mit rund 80 % auch ein großer Teil der 20 selektierten Phagen ohne Insert. Werden große Mengen solcher Phagen ohne künstliche Peptidsequenz selektiert, sollte das Screening-Protokoll überarbeitet werden, da in diesem Fall zahlreiche unspezifische Wechselwirkungen auftraten. Eine Optimierung des Protokolls kann meist über einen erhöhten Selektionsdruck erreicht werden bspw. durch kürzere Inkubationszeiten der Bibliothek mit dem Substrat oder durch stärkere Waschbedingungen. Daher wurde das Screening-Protokoll zur Selektion Toner-bindender Peptide optimiert. Dafür wurde das zuvor verwendete Standard-Protokoll, im Folgenden als *T1* bezeichnet, abgeändert, um auf zwei unterschiedlichen Wegen (*T2* & *T3*) einen höheren Selektionsdruck zu generieren. Tabelle 4.5 bietet eine Übersicht der verschiedenen Screening-Protokolle. Das Protokoll *T2* nutzt neben verkürzten Inkubationszeiten kurze Ultraschall-Intervalle während der Inkubation der Substrate. Diese sollen schwach am Substrat bindende Phagen wieder ablösen und somit wieder neue Bindungsstellen für potentiell stärker bindende Phagen zur Verfügung stellen. Im Screening Protokoll *T3* werden ebenfalls kürzere Inkubationszeiten eingesetzt, jedoch ohne den Einsatz von Ultraschall. Außerdem wurde hier die Negativselektion erst ab der dritten Runde angewandt, um die Bibliothek mit Toner-bindenden Peptiden anzureichern, bevor Kreuzbinder für beide Substrate ausselektiert wurden. Zusätzlich wurden bei beiden Protokollen Waschschrte bei pH 2,2 zur Elution schwach bindender Phagen verstärkt. Beide Protokolle wurden ebenfalls für vier Screening-Runden durchgeführt.

**Tabelle 4.5.** Zusammenfassung der durchgeführten Phagen-Display Protokolle an beiden Substraten; wichtige Veränderungen sind fett hervorgehoben; US: Ultraschall, TBST: Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20.

Screening-Protokoll	Inkubation Anti-Substrat	Inkubation Substrat	Waschschrte	Elution
<b><i>C1</i></b>	30 min (25 °C, 750 U/min)	30 min (25 °C, 750 U/min)	1) 10 x 1 min mit TBST; 2) 1 x 10 min bei pH 2,2 (25 °C, 750 U/min)	30 min Trypsin (25 °C, 750 U/min)
<b><i>T1</i></b>	30 min (25 °C, 750 U/min)	30 min (25 °C, 750 U/min)	1) 10 x 1 min mit TBST; 2) 1 x 10 min bei pH 2,2 (25 °C, 750 U/min)	30 min Trypsin (25 °C, 750 U/min)
<b><i>T2</i></b>	<b>10 min</b> (25 °C, 1000 U/min), dabei <b>pro 2 min</b> <b>2 s US</b>	<b>10 min</b> (25 °C, 1000 U/min), dabei <b>pro 2 min</b> <b>2 s US</b>	1) 10 x 1 min mit TBST; 2) 1 x <b>20 min</b> bei pH 2,2 (25 °C, 1000 U/min)	30 min Trypsin (25 °C, <b>1000 U/min</b> )

<b>T3</b>	<b>Nur 3./4. Runde;</b> <b>15 min</b> (25 °C, 1000 U/min)	<b>15 min</b> (25 °C, 1000 U/min)	1) 10 x 1 min mit TBST; 2) <b>10 x 1 min</b> bei pH 2,2 (25 °C, 1000 U/min)	30 min Trypsin (25 °C, <b>1000 U/min</b> )
-----------	---	--------------------------------------	---	---

Durch diese Änderungen wurden weniger Phagen ohne Insert selektiert als vorher. Tabelle 4.6 gibt einen Überblick der analysierten Phagen und deren Vielfalt für die unterschiedlichen Screening-Protokolle. Für Protokoll *T2* wurden wie zuvor Phagen aus Runde drei und vier analysiert. Bei Protokoll *T3* wurden zusätzlich auch aus der zweiten Runde Phagen sequenziert, um eine eventuelle Häufung der Phagen ohne Insert in den späteren Runden auszuschließen. Hinsichtlich ihrer Sequenzen werden die unterschiedlichen Peptide im folgenden Kapitel genauer analysiert.

**Tabelle 4.6.** Zusammenfassung aller analysierten Phagen und der erhaltenen Sequenzen aus den unterschiedlichen Phagen-Display-Protokollen.

Screening-Protokoll	Substrat	Analysierte Phagen	Phagen ohne Insert	Erhaltene Sequenzen
<b>C1</b>	Cellulose	20	2 (10%)	16
<b>T1</b>	Toner	20	16 (80%)	3
<b>T2</b>	Toner	19	10 (53%)	1
<b>T3</b>	Toner	30	20 (66%)	6

Tabelle 4.6 zeigt, dass die Protokolle *T2* und *T3* zwar weniger Phagen ohne Insert hervorbrachten als *T1*, aber dennoch wurden auch auf diesen Wegen mit jeweils über 50 % noch relativ viele solcher Phagen selektiert. Dafür kann es unterschiedliche Gründe geben. Die Oberfläche des Toners ist aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung aus dem Poly(styrol-*co*-butylacrylat) sehr hydrophob. Möglicherweise treten dadurch unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen mit gewissen Hüllproteinen der Phagen auf. Es ist weiterhin möglich, dass trotz des Einsatzes eines Detergenz (Tween 20®) im Puffer die Oberfläche des Toners nicht ausreichend benetzt werden konnte, um genügend Kontakt mit der Phagenlösung herzustellen. Nichtsdestotrotz konnten einige Toner-bindende Sequenzen selektiert werden, die in Tabelle 4.7 zusammengefasst sind.



**Tabelle 4.7.** Zusammenfassung der am Toner selektierten Peptidsequenzen.

Sequenz	Häufigkeit	Panning Runde	Screening Protokoll
SQDIRTWNGTRS	1	3	T1
VPTSQAGSGTVT	1	3	T1
SGVYKVAYDWQH	3	3, 4	T1, T3
LPVNGDAELWHS	9	3, 4	T2
AGLSFTGNTPPR	1	2	T3
TVLTFTHSNYGH	1	2	T3
QEVRFVRTTNGA	1	2	T3
NLFGSGTVRLAA	1	2	T3
GLHTSATNLYLH	5	3, 4	T3

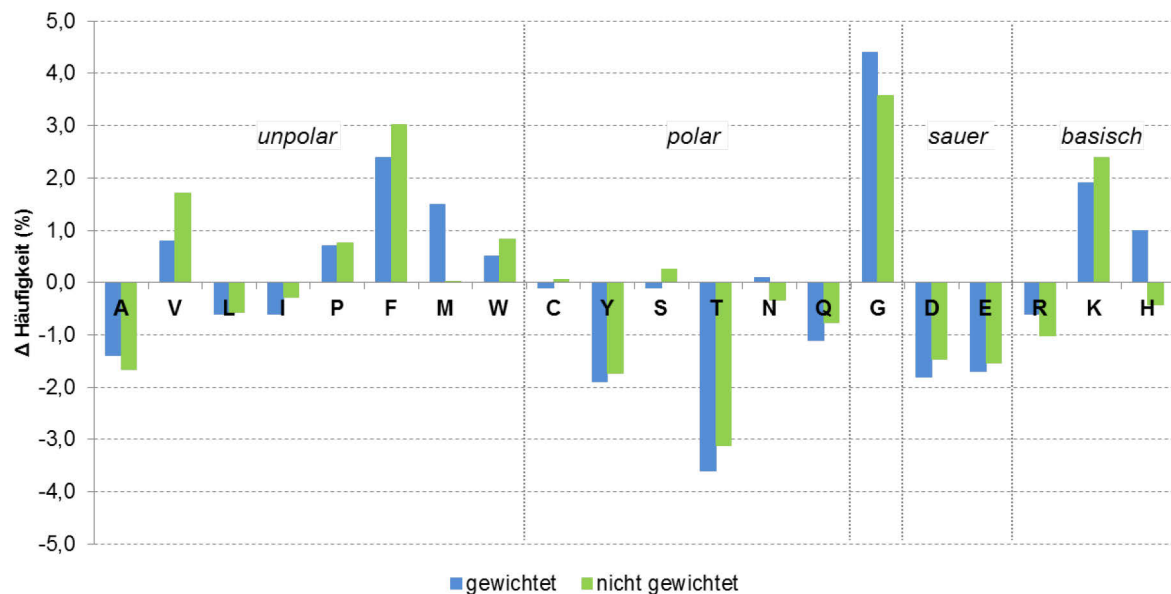
Dabei ist besonders hervorzuheben, dass die Sequenz SGVYKVAYDWQH mehrfach und mittels zweier unterschiedlicher Screening-Protokolle selektiert wurde. Innerhalb eines Screening-Protokolls wurden die Sequenzen LPVNGDAELWHS und GLHTSATNLYLH ebenfalls mehrfach erhalten. Im Folgenden werden alle selektierten Sequenzen beider Substrate hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus den einzelnen Aminosäuren genauer analysiert.

#### 4.2.2 Auswertung erhaltener Sequenzen

##### 4.2.2.1 Cellulose

Eine statistische Auswertung der erhaltenen Sequenzen kann zeigen, ob bestimmte Aminosäuren an bestimmten Positionen in den selektierten 12-mer Peptidsequenzen mit steigender Screening-Runde häufiger auftreten. Außerdem ist es möglich, dass für die Bindung entscheidende Aminosäuren zahlreicher auftreten als andere. Daher wurden sowohl die Cellulose- als auch die Toner-bindenden Sequenzen hinsichtlich ihrer statistischen Zusammensetzung untersucht.

Wie in Kapitel 2.3.2 erwähnt, ist die verwendete Phagenbibliothek aus den 20 kanonischen Aminosäuren aufgebaut. Abbildung 4.9 zeigt die prozentualen Abweichungen der Häufigkeiten, mit denen einzelne AS innerhalb der Cellulose-bindenden Sequenzen unabhängig von ihrer Position auftreten, ausgehend von der Zusammensetzung der initial eingesetzten Phagenbibliothek. Dabei wurden gewichtete und nicht gewichtete Häufigkeiten gegenübergestellt.

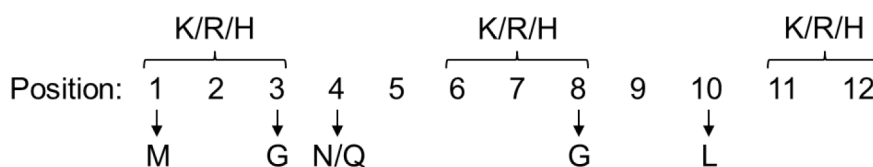


**Abbildung 4.9.** Prozentuale Häufigkeit einzelner Aminosäuren im Vergleich zur initialen Phagenbibliothek (unabhängig von der Position der AS) beim Cellulose-Screening; gewichtet: mehrfach auftretende Sequenzen zählen entsprechend ihrer Häufigkeit, nicht gewichtet: mehrfach auftretende Sequenzen zählen einmal.

Besonders auffällig ist das erhöhte Auftreten von G, K und F, während Y, T und die sauren Aminosäuren E und D seltener vorkommen als in der ursprünglichen Phagenbibliothek. Interessant ist, dass die unpolare aromatische Aminosäure F und in geringerem Maße auch W, im Gegensatz zur polaren aromatischen Aminosäure Y angereichert werden. Das verringerte Auftreten von Y, T und den sauren Aminosäuren D und E lässt sich möglicherweise durch abstoßende Wechselwirkungen durch die Cellulose-eigenen Hydroxylgruppen erklären. Im Gegensatz dazu wird vor allem die basische Aminosäure K häufiger gefunden. Möglicherweise bildet diese Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hydroxylgruppen der Cellulose aus. Die Anreicherung von G spricht dafür, dass eine gewisse Flexibilität der Sequenzen wichtig ist, da G mehr Freiheitsgrade als andere Aminosäuren besitzt. Dadurch wird die Sequenz flexibler und kann sich besser an die Struktur der Cellulose anpassen. Die Gegenüberstellung gewichteter und nicht gewichteter Häufigkeiten kann interessant sein, da hier große Unterschiede auftreten können, wenn eine Sequenz deutlich häufiger selektiert wird als andere. Solch eine Sequenz muss aber nicht zwangsläufig ein besserer Binder für das Substrat sein. Es wurde bereits beobachtet, dass Phagenklone, die eine bestimmte Sequenz in sich tragen, schneller amplifiziert werden und sich so in der Phagenbibliothek anreichern, obwohl sie keine nennenswerte Affinität zum jeweiligen Substrat aufweisen.<sup>[138, 249, 250]</sup> Gewissheit können in diesem Fall nur weiterführende Bindungsstudien mit den synthetisierten Sequenzen geben (siehe Kapitel 4.3). Bis auf die geringe Abweichung der Häufigkeiten von H gibt es in Abbildung 4.9 allerdings keine ausgeprägten

Unterschiede zwischen den gewichteten und den nicht gewichteten Daten. Dies ist nicht weiter überraschend, da keine der Cellulose-bindenden Sequenzen mit auffälliger Häufigkeit selektiert wurde. Anders verhält es sich beim Toner-Screening (vgl. Kapitel 4.2.2.2).

Zur weiteren Analyse wurden die selektierten Sequenzen auch hinsichtlich auffälliger Anreicherungen bestimmter Aminosäuren abhängig von ihrer Position in der Peptidsequenz untersucht. Tabelle 6.4 (Kapitel 6.4) zeigt in ausführlicher Form diese statistische Analyse, während Abbildung 4.10 die wichtigsten Erkenntnisse daraus zusammenfasst. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Häufung von M an erster Position und Amid-haltiger Aminosäuren an vierter Position (besonders N), sowie an dritter und achter Position das erhöhte Vorkommen von G. Ebenfalls auffällig ist die Häufung von basischen Aminosäuren am Anfang (Position 1 und 2), der Mitte (Position 6-8) und dem Ende (Position 11-12) der Sequenzen. Erstaunlich oft erscheint an 10. Position L als unpolare aliphatische Aminosäure. Denkbare Wechselwirkungen zwischen diesen Aminosäuren und der Cellulose sind vor allem Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amid- von N und Q an vierter Position, sowie zu den basischen Aminosäuren. Es bleibt dennoch zu erwähnen, dass 18 Sequenzen nur ansatzweise eine statistische Auswertung der Daten erlauben. Üblicherweise werden in der Literatur für konkrete Aussagen bezüglich der Anreicherung bestimmter Aminosäuren größere Datensätze verwendet.<sup>[249]</sup>



**Abbildung 4.10.** Zusammenfassung auffälliger Häufigkeiten bestimmter Aminosäuren an bestimmten Positionen innerhalb der an Cellulose selektierten 12-mer Sequenzen.

Neben den genannten statistischen Auffälligkeiten wiesen einige der selektierten Cellulose-bindenden Sequenzen erstaunliche Übereinstimmungen mit Cellulose Bindungsdomänen (CBDs) aus Proteinen celluloseabbauender Bakterien auf. Diese Übereinstimmungen wurden mittels eines mathematischen Suchvorgangs einer großen Protein-Datenbank, dem so genannten Protein-BLAST der NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) Datenbank gefunden. Es konnten drei selektierte Sequenzen identifiziert werden, die bemerkenswerte Übereinstimmungen mit CBDs aus unterschiedlichen Proteinen zeigen. Tabelle 4.8 zeigt einen Überblick dieser Übereinstimmungen, welche die hohe Qualität der selektierten Sequenzen verdeutlichen.

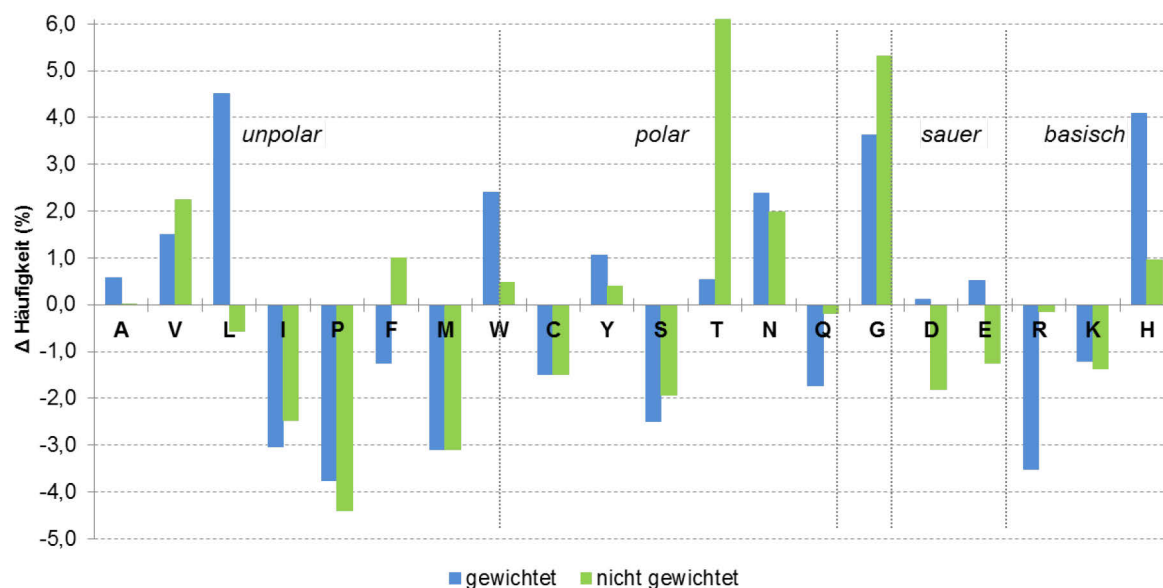
**Tabelle 4.8.** Zusammenfassung der gefundenen Übereinstimmungen von im Phagen-Display an Cellulose selektierten Peptidsequenzen mit CBDs aus Proteinen celluloseabbauender Bakterien; Übereinstimmungen sind fett und unterstrichen hervorgehoben.

Sequenz	übereinstimmender Sequenzbereich mit CBD	Protein (Anzahl AS)	Bakterium
MHPNAGHGSLMR	952 - <u>MHPNSGQ</u> - 958	Glycosid Hydrolase (1001)	<i>Cellulomonas flavigena</i> DSM 20109
	327 - <u>MVHNAGHN<u>GS</u>L</u> - 337	Chitin bindendes Protein (365)	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
TPQSF <del>W</del> QKGSLV	631 - <u>TPQSF<del>W</del></u> - 636	Endo-1,4-betaxylanase (715)	<i>Cellulosilyticum lentocellum</i>
	760 - <u>PQSF<del>W</del></u> - 764	Beta-Mannosidase (859)	<i>Paenibacillus sp. FSL H7-689</i>
GDGNSVLKPGNW	260 - <u>GDGTATLKP<u>K</u>SW</u> - 271	CBD enthaltende Proteine (309; 653; 671)	<i>Methylococcus capsulatus str. Bath</i>
	413 - <u>NAV<u>L</u>KPG</u> - 419	Serin/Threonin Protein Kinase (446; 450)	<i>Amycolatopsis rifamycinica</i> ; <i>Amycolatopsis mediterranei</i>

Im Vergleich mit literaturbekannten, mittels Phagen-Display selektierten Bindungssequenzen für Cellulose zeigten sich hingegen kaum Übereinstimmungen. Es wurden keine bereits bekannten Sequenzen selektiert (vgl. Kapitel 2.4.2, Tabelle 2.2), sondern nur wenige Aminosäuren an bestimmten Positionen wie Histidin an zweiter Position wieder gefunden. Dies verdeutlicht sowohl die Komplexität des Phagen-Displays als Selektionsmethode als auch die komplizierte Struktur biologischer Stoffe. Dennoch konnte aufgrund der Analogien zu CBDs aus Bakterien bereits an dieser Stelle gezeigt werden, dass mittels Phagen-Display potente Cellulose-bindende Sequenzen selektiert wurden.

#### 4.2.2.2 Toner

Analog zum oben beschriebenen Vorgehen zeigt Abbildung 4.11 die prozentualen Abweichungen der Häufigkeiten einzelner Aminosäuren innerhalb der Toner-bindenden Sequenzen ausgehend von der ursprünglichen Zusammensetzung der eingesetzten Phagenbibliothek.

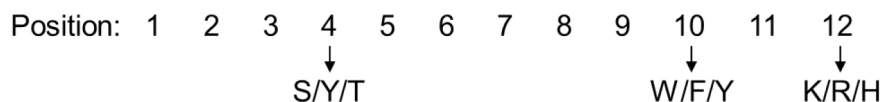


**Abbildung 4.11.** Prozentuale Häufigkeit einzelner Aminosäuren im Vergleich zur initialen Phagenbibliothek (unabhängig von der Position der Aminosäure) beim Toner-Screening; gewichtet: mehrfach auftretende Sequenzen zählen entsprechend ihrer Häufigkeit, nicht gewichtet: mehrfach auftretende Sequenzen zählen nur einmal.

Darin zeigt sich generell eine überraschende Abnahme der unpolaren Aminosäuren I, P und M. Dabei wäre eine Zunahme unpolarer hydrophober Aminosäuren zu erwarten, da diese in ihrer Struktur dem im Tonerpolymer enthaltenen Butylacrylat ähneln. Ebenfalls zu erwarten wäre eine Häufung aromatischer Aminosäuren, besonders von F, da  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit den Styroleinheiten im Tonerpolymer gut denkbar wären. Erstaunlicherweise wurden aber nur G, N und V eindeutig gehäuft vorgefunden. Wie bereits erwähnt, führt der mehrfache Einbau von G zu einer erhöhten und vorteilhaften Flexibilität der 12-mer Peptidsequenzen. Bei der relativ rauen Oberfläche der gemörserten Tonerpartikel kann dies möglicherweise von Vorteil sein, da entsprechend flexible Peptide benötigt werden, um flächendeckend effektiv an der Toneroberfläche zu binden. Diese Vermutung wird auch durch die verringerte Häufigkeit von P unterstützt, da P die Flexibilität innerhalb einer Sequenz generell verringert. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidgruppen von N mit den Estergruppen des Butylacrylats ist weiterhin ebenso denkbar wie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen V und den Butylgruppen. In Abbildung 4.11 sind weiterhin die gewichteten und nicht gewichteten Häufigkeiten gegenübergestellt. Dabei fällt besonders bei den Aminosäuren L, W, T, R und H eine große Diskrepanz auf. Dies ist hauptsächlich auf die große Häufigkeit der Sequenz LPVNGDAELWHS zurück zu führen. L, W und H sind darin enthalten und dementsprechend in der gewichteten Auftragung häufiger zu finden als T und R, die darin nicht enthalten sind. Wie bereits erwähnt, kann die Anreicherung einer Sequenz während des Screenings entweder auf eine

starke Bindung an das Substrat hinweisen oder auf Amplifikationsvorteile der entsprechenden Phagenklone. Im Fall von Protokoll T2 wurde aus der dritten und vierten Screening-Runde aus 19 selektierten Phagen ausschließlich eine einzige Sequenz erhalten (9x). Dies kann durchaus vorkommen,<sup>[102]</sup> ist aber doch eher ungewöhnlich. Tatsächlich zeigte eine genaue Analyse von Punktmutationen, dass die erhaltenen Sequenzen alle genau übereinstimmen und es daher nahe liegt, dass hier Klone von ein und demselben Phagen analysiert wurden (vgl. Tabelle 6.3). Eine mögliche Erklärung kann hier bei dem im Screening verwendeten Ultraschall liegen. Eventuell zeigten diese Phagenklone eine größere Stabilität gegenüber den Ultraschallwellen, während andere Phagenkörper durch die eingesetzte Frequenz auseinanderbrachen. Denn obwohl hier nur kurze Ultraschall-Intervalle eingesetzt wurden und es auch in der Literatur schon einige Beispiele für den Einsatz von Ultraschall im Phagen-Display gibt,<sup>[251, 252]</sup> fehlen dennoch ausführliche Studien zur Stabilität der Phagenkörper gegenüber Ultraschallwellen.

Weiterhin wurde analog zum vorherigen Kapitel die statistische Anreicherung bestimmter Aminosäuren abhängig von ihrer Position in den Toner-bindenden Peptidsequenzen analysiert (vgl. Tabelle 6.5 in Kapitel 6.4). Auffällig sind dabei das komplette Fehlen S-haltiger Aminosäuren sowie das gesteigerte Vorkommen hydroxylierter Aminosäuren an vierter Position, aromatischer Aminosäuren an Position 10 und basischer Aminosäuren an Position 12. Das Fehlen S-haltiger Aminosäuren überrascht nicht, da diese in erster Linie angereichert werden, wenn S-Brücken zu Schwefel-haltigen funktionellen Gruppen im Substrat aufgebaut werden können. Da diese im Toner nicht vorhanden sind, werden M und C im Screening wahrscheinlich diskriminiert. Die Häufung aromatischer Aminosäuren an Position 10 spricht dafür, dass diese Stellung in der 12-mer Sequenz günstig für  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit Styroleinheiten des Tonerpolymers zu sein scheint. Der Abstand zu basischen Aminosäure-Seitenketten an Position 12 kann möglicherweise Wasserstoffbrückenbindungen zu Estergruppen an dieser Position begünstigen. Zusätzlich ist bekannt, dass die Oberfläche von Polystyrol meist negativ geladen ist<sup>[253, 254]</sup> und auch der Toner selbst wird durch Additive negativ aufgeladen,<sup>[255, 256]</sup> um den Druckvorgang zu ermöglichen (vgl. Kapitel 2.2.3.2). Auch dies fördert die Wechselwirkung mit basischen Aminosäuren.



**Abbildung 4.12.** Zusammenfassung auffälliger Häufigkeiten bestimmter Aminosäuren an bestimmten Positionen innerhalb der am Toner selektierten 12-mer Sequenzen.

### 4.3 Erste Adsorptionsuntersuchungen an isolierten Substraten

Nach der ausführlichen Analyse der Ergebnisse des durchgeführten Phagen-Displays wurden einige der selektierten Peptidsequenzen mittels festphasengebundener Peptidsynthese (*solid-phase peptide synthesis*, SPPS) synthetisiert und auf ihre Adsorptionseigenschaften zu beiden Substraten im Einzelnen analysiert.

Dafür wurden jeweils drei der an Cellulose und Toner selektierten Peptide für weiterführende Untersuchungen ausgewählt. Im Fall von Cellulose handelte es sich hierbei um die drei Peptide MHPNAGHGSLMR, TPQSFQKGS LV und GDGNSVLKPGNW, welche bemerkenswerte Übereinstimmungen mit den CBDs verschiedener Proteine zeigten (vgl. Tabelle 4.8). Von den Toner-bindenden Peptiden wurden die Sequenzen SGVYKVAYDWQH, LPVNGDAELWHS und GLHTSATNLYLH ausgewählt, die alle mehrfach selektiert wurden (vgl. Tabelle 4.7). Diese sechs Sequenzen wurden mittels automatisierter, festphasengebundener Peptidsynthese hergestellt. Tabelle 4.9 gibt einen Überblick über die ausgewählten Peptide und deren Bezeichnungen in den folgenden Kapiteln.

**Tabelle 4.9.** Zusammenfassung der aus dem Phagen-Display erhaltenen und mittels SPPS synthetisierten Peptidsequenzen inklusive des adressierten Substrats, der Häufigkeit im Pool der sequenzierten Phagenklone und der Bezeichnung im Folgenden; *N*-terminale G<sub>3</sub>-Sequenz dient als Abstandshalter zu Fluoreszenz- und Ramanmarkern; CBP: Cellulose-bindendes Peptid, TBP: Toner-bindendes Peptid.

Sequenz	Substrat	Häufigkeit	Bezeichnung
GGG-MHPNAGHGSLMR	Cellulose	3	CBP1
GGG-TPQSFQKGS LV	Cellulose	1	CBP2
GGG-GDGNSVLKPGNW	Cellulose	1	CBP3
GGG-SGVYKVAYDWQH	Toner	3	TBP1
GGG-LPVNGDAELWHS	Toner	9	TBP2
GGG-GLHTSATNLYLH	Toner	5	TBP3

Da diese Peptide für unterschiedliche Untersuchungsmethoden später noch modifiziert werden sollten, wurde *N*-terminal ein kurzes Tripeptid aus drei Glycinen eingebaut. Dadurch wird sterisch

ausreichend Abstand von nachträglich eingebauten Fluoreszenz- oder Ramanmarken zur Adsorptionsdomäne garantiert.

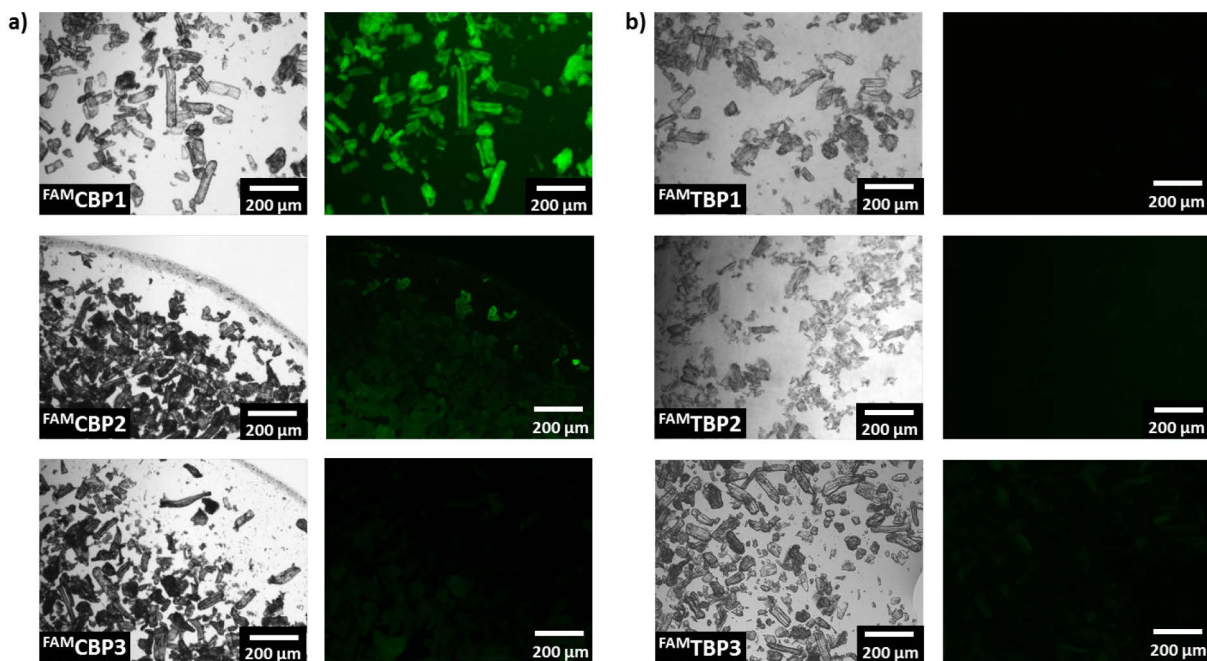
#### 4.3.1 Untersuchungen zur Spezifität der Peptide

Als erstes wurden alle synthetisierten Peptide mittels Fluoreszenzmikroskopie und -spektroskopie hinsichtlich ihrer Adsorption an beiden Substraten untersucht. Dafür wurde der Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein *N*-terminal an die Peptide gekuppelt. Dieser weist ein Absorptionsmaximum bei 492 nm und ein Emissionsmaximum bei 517 nm auf. Im Folgenden wird dies gekennzeichnet, indem die hochgestellte Bezeichnung FAM (*fluorescent amine marker*) vor die Peptide gesetzt wird.

##### 4.3.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

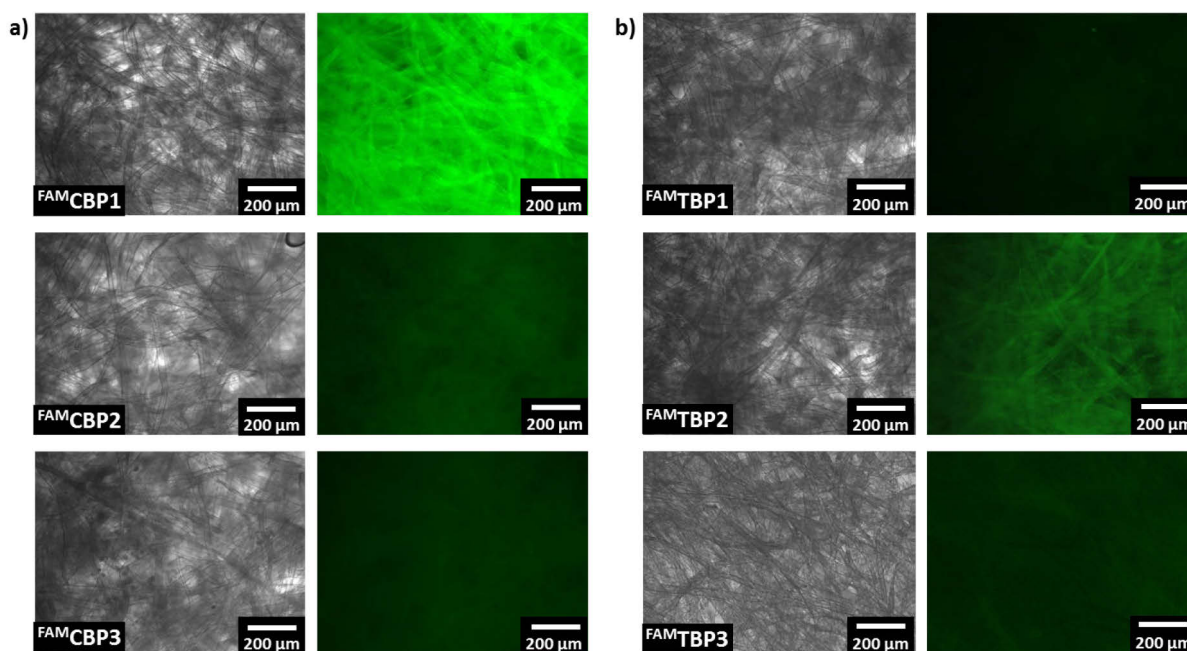
Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden die einzelnen Substrate mit den jeweiligen Peptiden in wässrigem Puffer inkubiert. Anfangs wurde hierfür TBST Puffer genutzt, der auch während des Screenings im Phagen-Display eingesetzt wurde. Es wurden 0,1 mM Peptidlösungen hergestellt. Die Substrate wurden 10 min mit diesen Lösungen inkubiert und anschließend fünfmal mit TBST Puffer gewaschen. Abbildung 4.13 zeigt licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des untersuchten Cellulosepulvers, das jeweils mit einem der Peptide inkubiert wurde.





**Abbildung 4.13.** Mikroskopische Aufnahmen von Cellulosepulver, inkubiert mit den jeweiligen a) Cellulose- oder b) Toner-bindenden Peptiden; es sind jeweils die Durchlichtaufnahmen (links) und die Fluoreszenzaufnahmen im FAM-Kanal (rechts) gegenüber gestellt; [Bedingungen: je 3 mg Substrat, 10 min Inkubation mit je 1 mL 0,1 mM Peptidlösungen in TBST Puffer (0,5 mM, pH 7,5) bei RT, 5 x je 2 min in TBST Puffer waschen].

Daraus wird ersichtlich, dass von den Cellulose-bindenden Peptiden <sup>FAM</sup>CBP1 die deutlichste Adsorption zur Cellulose zeigt, wohingegen <sup>FAM</sup>CBP2 und <sup>FAM</sup>CBP3 unter gleichen Bedingungen nur schwache Fluoreszenz am Substrat aufweisen. Positiv ist hier hervorzuheben, dass alle drei Toner-bindenden Peptide unter diesen Bedingungen keine nennenswerte Fluoreszenz aufweisen. Zur weiteren Analyse wurde analog auch das Filterpapier mit den einzelnen Peptiden inkubiert. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4.14 dargestellt.

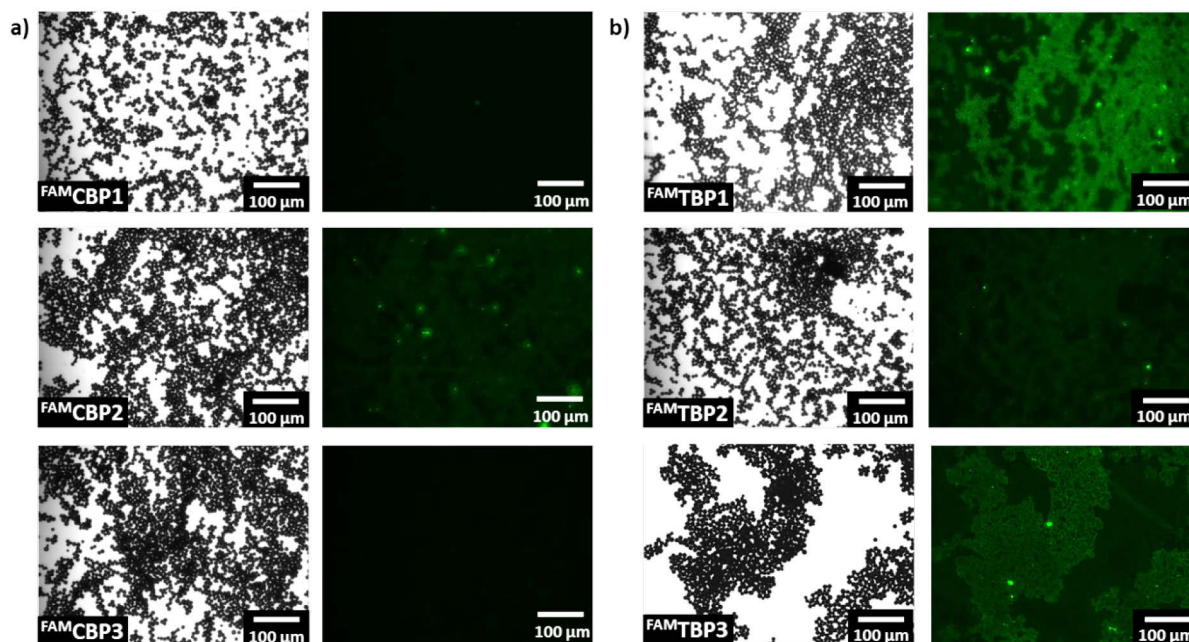


**Abbildung 4.14.** Mikroskopische Aufnahmen von Filterpapier, inkubiert mit den jeweiligen a) Cellulose- und b) Toner-bindenden Peptiden; es sind jeweils die Durchlichtaufnahmen (links) und die Fluoreszenzaufnahmen im FAM-Kanal (rechts) gegenüber gestellt; [Bedingungen: je 5 mg Substrat, 10 min Inkubation mit je 1 mL 0,1 mM Peptidlösungen in TBST Puffer (0,5 mM, pH 7,5) bei RT, 5 x je 2 min in TBST Puffer waschen].

Darin zeigt sich analog zum Cellulosepulver, dass  $^{FAM}CBP1$  am stärksten am Filterpapier adsorbiert. Ebenfalls ist bei  $^{FAM}CBP2$  und  $^{FAM}CBP3$  eine leichte Fluoreszenz erkennbar. Während  $^{FAM}TBP1$  erneut keine nennenswerte Affinität zum Filterpapier zeigte, konnte eine leichte Adsorption von  $^{FAM}TBP3$  und eine etwas stärkere Adsorption von  $^{FAM}TBP2$  festgestellt werden. Unterschiede zu den Untersuchungen an der kristallinen Cellulose könnten möglicherweise auf physikalischen Wechselwirkungen beruhen. Durch die Migration in Hohlräume zwischen den Cellulosefasern und Kapillarkräfte im Filterpapier werden schwächer adsorbierende Peptide aus der Faserstruktur möglicherweise langsamer heraus-gewaschen als von den einzelnen Cellulosekristallen. Möglicherweise sind auch Unterschiede in der Struktur der Cellulosekristalle und –fasern hierfür verantwortlich (amorph oder kristallin), die mittels Raman-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden konnten (vgl. Kapitel 2.4.1).

Abbildung 4.15 zeigt äquivalent zu den vorherigen Abbildungen inkubierte Tonerpartikel. Hierfür wurde der Toner in seiner monodispersen Form verwendet, wie er vor dem Drucken vorliegt. Größere Tonerpartikel, wie sie nach dem Aufschmelzen und anschließend, manuellem Zerkleinern entstehen, sind für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ungeeignet. Denn aufgrund ihrer Größe und ihrer schwarzen Farbe absorbieren sie einen Großteil der ausgestrahlten Fluoreszenz. Dies fällt bei den deutlich kleineren monodispersen Partikeln weniger ins Gewicht

und vereinfacht somit die Messung der von den fluoreszenzmarkierten Peptiden emittierten Strahlung.



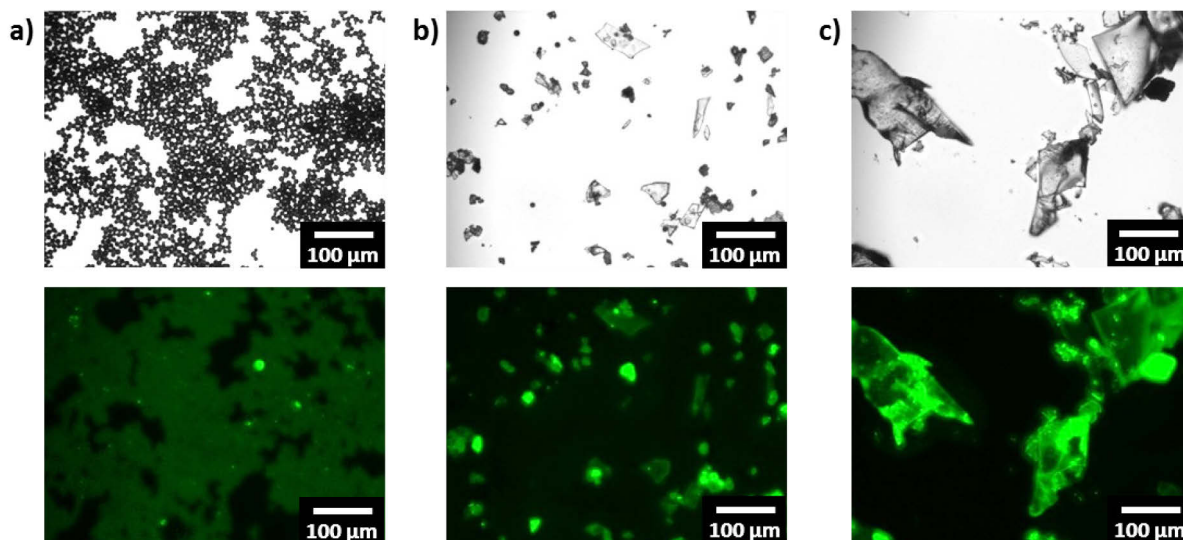
**Abbildung 4.15.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von monodispersen Tonerpartikeln, inkubiert mit den jeweiligen a) Cellulose- und b) Toner-bindenden Peptiden; es sind jeweils die Durchlichtaufnahmen (links) und die Fluoreszenzaufnahmen im FAM-Kanal (rechts) gegenüber gestellt; [Bedingungen: je 3 mg Substrat, 10 min Inkubation mit je 1 mL 0,1 mM Peptidlösungen in TBST Puffer (0,5 mM, pH 7,5) bei RT, 5 x je 2 min in TBST Puffer waschen].

Dabei zeigt sich, dass <sup>FAM</sup>TBP1 von allen drei Toner-bindenden Peptiden die stärkste Fluoreszenz aufwies, also am meisten am Toner adsorbierte. Aber auch <sup>FAM</sup>TBP3 und deutlich schwächer auch <sup>FAM</sup>TBP2 zeigten Fluoreszenz und bestätigten so die Adsorption der Peptide auf der Toneroberfläche. Weiterhin fällt auf, dass auch die mit <sup>FAM</sup>CBP2 inkubierten Tonerpartikel leicht fluoreszent waren, was darauf hindeutet, dass <sup>FAM</sup>CBP2 keine ausreichend spezifische Adsorption zum gewünschten Substrat zeigt wie sie für das Gelingen dieser Arbeit zwingend erforderlich ist.

Zusammenfassend zeigen diese fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, dass <sup>FAM</sup>CBP1 und <sup>FAM</sup>TBP1 jeweils die deutlichste und auch eine spezifische Adsorption zu den gewünschten Substraten aufweisen. Sowohl <sup>FAM</sup>CBP2 als auch <sup>FAM</sup>TBP2 scheinen weniger spezifisch und etwas geringer an den gewünschten Substraten zu adsorbieren. <sup>FAM</sup>CBP3 zeigt zwar am Cellulosepulver keine nennenswerte Adsorption, aber eine schwache Adsorption am Filterpapier. <sup>FAM</sup>TBP3 adsorbiert wie gewünscht spezifisch am Toner, wenn auch weniger als <sup>FAM</sup>TBP1.

Weiterhin konnten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass tatsächlich das Copolymer, welches den Hauptbestandteil des Toners darstellt, als Substrat für die Toner-

bindenden Peptide dient. Dafür wurden sowohl das aus dem Toner extrahierte Polymer als auch das synthetisch hergestellte Copolymer analog zu den vorherigen Experimenten exemplarisch mit dem besten Toner-bindendem Peptid <sup>FAM</sup>TBP1 inkubiert. Da diese Copolymere im Gegensatz zum Toner farblos sind, entstehen beim Aufschmelzen und anschließendem manuellem Zerkleinern analog zum Druckvorgang keine Partikel, welche die Fluoreszenz absorbieren würden. Daher wurde in diesem Fall der Fixierschritt im Drucker entsprechend simuliert, bevor die Partikel inkubiert wurden.



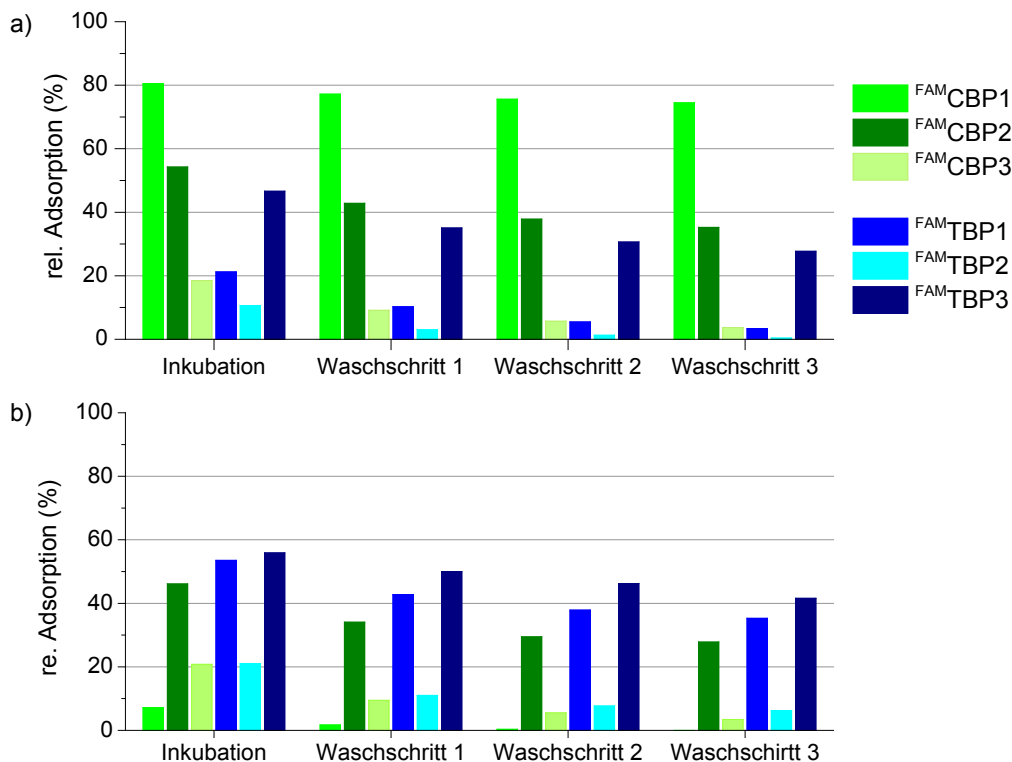
**Abbildung 4.16.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von a) schwarzen monodispersen Tonerpartikeln und den farblosen Copolymeren b) des Tonerextrakts und c) des Syntheseprodukts inkubiert mit <sup>FAM</sup>TBP1; es sind jeweils die Durchlichtaufnahmen (oben) und die Fluoreszenzaufnahmen im FAM-Kanal (unten) gegenüber gestellt.

Abbildung 4.16 zeigt deutlich, dass beide Poly(styrol-*co*-butylacrylate) nach der Inkubation mit <sup>FAM</sup>TBP1 eine vergleichbare Fluoreszenz zeigen. Dies bestätigt, dass entscheidende Wechselwirkungen zwischen TBP1 und dem Toner zwischen Peptid und Copolymer stattfinden und andere Bestandteile des Toners, wenn nötig, vernachlässigt werden können. Dies legt weiterhin nahe, dass TBP1 auch an anderen Tonern, die auf einem ähnlichem Copolymer beruhen, adsorbieren könnte. Dies könnte sowohl farbigen Toner der gleichen Marke (BROTHER) als auch Toner anderer Hersteller (z. B. HP) betreffen. Für spätere Anwendungen ergibt sich dadurch eine breitere Anwendbarkeit, da lediglich ein Toner auf Basis eines Poly(styrol-*co*-butylacrylats) benötigt wird. Weiterführende Untersuchungen, die dies bestätigen, folgen im nächsten Kapitel (vgl. Abbildung 4.18).



#### 4.3.1.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Nach den ersten qualitativen fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde das Adsorptionsverhalten der einzelnen Peptide zu beiden Substraten auch mittels Fluoreszenzspektroskopie quantitativ analysiert. Dazu wurden jeweils 50 mg Cellulosepulver bzw. Tonerpartikel (vorher erhitzt und manuell zerkleinert) mit 1 mL einer 10  $\mu$ M Lösung der jeweiligen fluoreszenzmarkierten Peptide für 10 min inkubiert. Auch hier wurde analog zum Phagen-Display in verdünntem TBST Puffer gearbeitet. Nach der Inkubation mit den Peptiden wurden die Substrate noch dreimal für je 2 min mit TBST Puffer gewaschen, um die Stabilität der Peptidadsorption an den einzelnen Substraten zu analysieren. Die Fluoreszenzintensität der 10  $\mu$ M Stammlösungen der Peptide wurde jeweils als 100 % festgelegt. Anschließend konnte durch das Messen der Intensität der jeweiligen Überstände der Inkubations- und Waschlösungen direkt auf die an den Substraten adsorbierte Menge Peptid geschlossen werden. Dafür wurde vorher sichergestellt, dass bei den gemessenen Konzentrationen die Fluoreszenzintensität linear zur Peptidkonzentration im Überstand ist, indem die Lösungen vor den jeweiligen Messungen 1:10 verdünnt wurden.



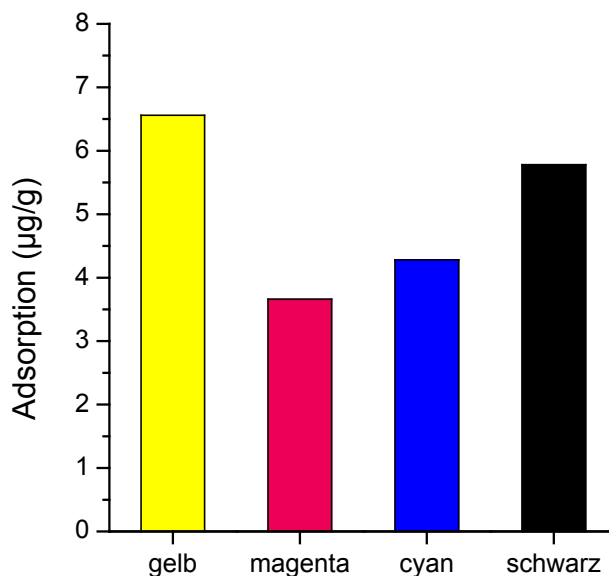
**Abbildung 4.17.** Kumulative Darstellung der relativen Adsorption einzelner Peptide an a) Cellulose und b) Toner nach Inkubation [Bedingungen: 50 mg Substrat, 10 min Inkubation mit je 1 mL 10  $\mu$ M Peptidlösungen in TBST Puffer (0,5 mmol, pH 7,5), 3 x je 2 min in TBST Puffer waschen].

Abbildung 4.17 zeigt die jeweilige relative Adsorption der einzelnen Peptide an beiden Substraten. Darin ist analog zu den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen deutlich zu erkennen, dass <sup>FAM</sup>CB1 mit ca. 75 % nach dreimaligem Waschen die höchste und zusätzlich kreuzspezifische Adsorption an Cellulose zeigte. Ebenso wurde durch diese Untersuchungen die mangelnde Spezifität von <sup>FAM</sup>CBP2 bestätigt, welches unter gegebenen Bedingungen an beiden Substraten eine ähnliche Adsorption von ca. 30 % aufwies. <sup>FAM</sup>CBP3 adsorbierte sehr schwach an beiden Substraten.

Auch bezüglich der Toner-bindenden Peptide wurden die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen durch diese Analysemethode überwiegend untermauert. <sup>FAM</sup>TBP1 zeigte mit ca. 35 % eine gute Adsorption am Toner und nach drei Waschschritten auch eine gute Selektivität, trotz anfänglicher geringer Adsorption an der Cellulose. Eine geringere Adsorption von <sup>FAM</sup>TBP2 am Toner wurde ebenso beobachtet wie eine mangelhafte Selektivität von <sup>FAM</sup>TBP3.

Zusätzlich wurden an dieser Stelle Untersuchungen an unterschiedlich farbigen Tonern durchgeführt, um die in Kapitel 4.3.1.1 dargelegte Vermutung zu bestätigen, dass die Adsorption von TBP1 zum Toner durch Wechselwirkungen zum Poly(styrol-*co*-butylacrylat) unabhängig von Wechselwirkungen zu Pigmenten oder anderen Additiven stattfindet. Dafür wurden Toner der Firma BROTHER in den Farben Gelb (TN-242Y), Cyan (TN-242C) und Magenta (TN-242M) weitestgehend analog zum oben beschriebenen Vorgehen mit fluoreszenzmarkiertem <sup>FAM</sup>TBP1 inkubiert. Um die unterschiedlichen Werte besser vergleichen zu können, ist in Abbildung 4.18 die Adsorption in µg Peptid pro g Toner angegeben. Es zeigte sich, dass die Adsorptionswerte an schwarzem und gelbem Toner im gleichen Bereich von ca. 6 µg/g liegen, während an magenta- und cyan-farbenem Toner etwas geringere Adsorptionsmengen von ca. 4 µg/g festgestellt wurden. In den Sicherheitsdatenblättern der einzelnen Toner fällt bei der Zusammensetzung auf, dass die magenta- und cyan-farbenen Toner deutlich mehr Fettsäureester enthalten (10-20 % anstatt 3-10 %) als die anderen beiden.<sup>[247, 257-259]</sup> Möglicherweise unterdrücken diese zu einem gewissen Teil die Wechselwirkungen zwischen Toner und Peptid bzw. führen zu einem geringeren Anteil von Polymer auf der Oberfläche der Tonerpartikel

Trotz leicht abweichender Adsorptionsmengen verdeutlichen diese Ergebnisse zusätzlich zu den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen am extrahierten und synthetisierten Tonerpolymer (vgl. Abbildung 4.16), dass die Adsorption von TBP1 am Toner nicht durch Wechselwirkungen mit Pigmenten beherrscht wird, sondern unabhängig von der Tonerfarbe stattfindet.



**Abbildung 4.18.** Adsorptionswerte von <sup>RhB</sup>TBP1 an verschiedenen farbigen Tonern der Firma BROTHER; [Bedingungen: 25 mg Substrat, 10 min Inkubation mit 1 mL einer 1 µM Peptidlösung in TBST Puffer (0,5 mmol, pH 7,5), dreimaliges Waschen für je 2 min in TBST Puffer].

Zusammenfassend zeigten CBP1 und TBP1 jeweils die besten Ergebnisse bezüglich der Adsorptionsmenge und ihrer Kreuzspezifität zum jeweiligen gewünschten Substrat. In allen folgenden Untersuchungen wurden daher die Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Peptiden und den einzelnen Substraten genauer analysiert.

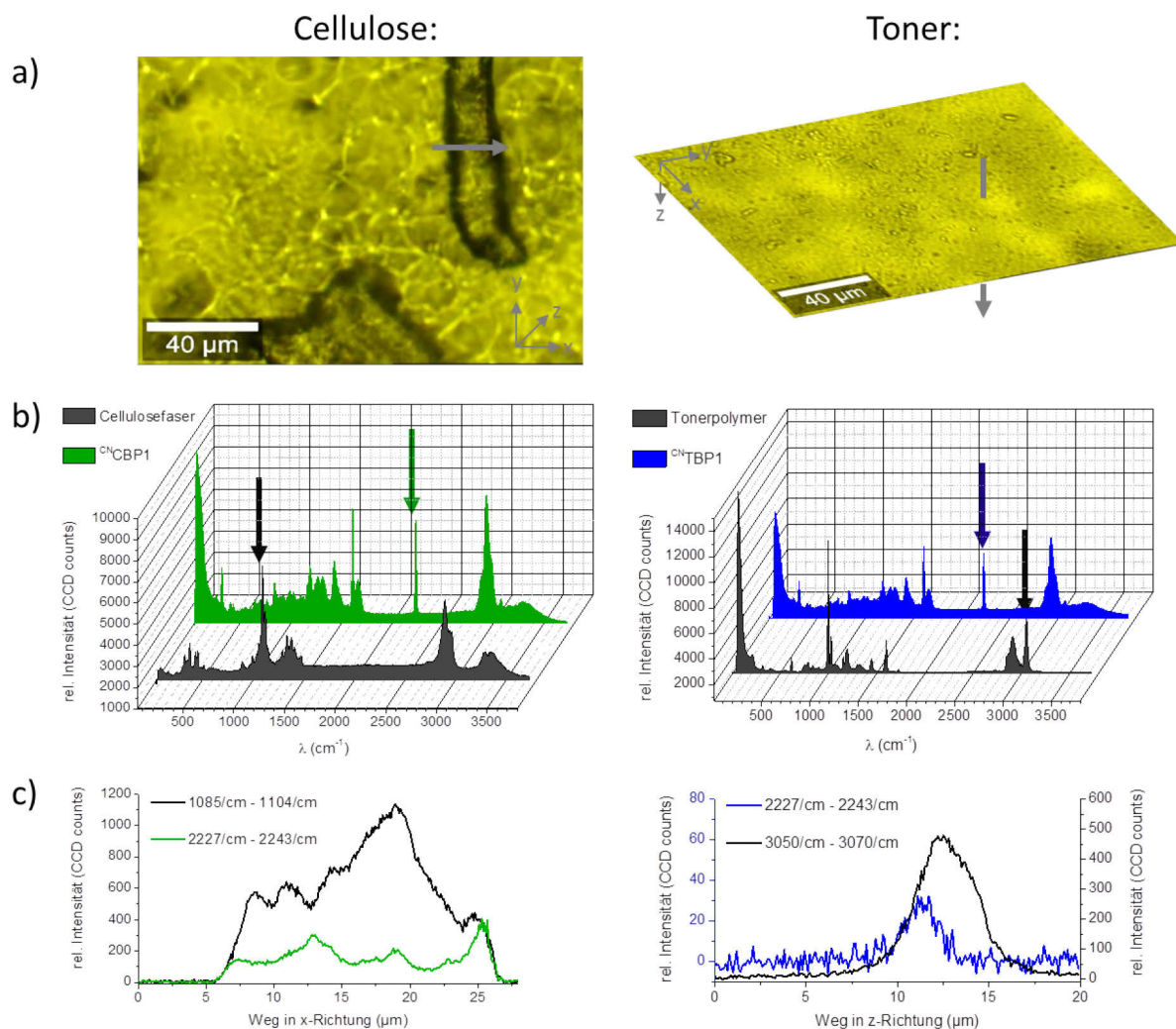
#### 4.3.2 Raman-Spektroskopie

Mithilfe der Ramanmikroskopie konnte zusätzlich bestätigt werden, dass CBP1 und TBP1 an den gewünschten Substraten adsorbieren. Dafür wurden die Peptide *N*-terminal mit Cyanobenzoessäure funktionalisiert. Dies wird im Folgenden gekennzeichnet, indem die hochgestellten Buchstaben „CN“ der Peptidbezeichnung vorangestellt werden (<sup>CN</sup>CBP1 bzw. <sup>CN</sup>TBP1). Die Bande der enthaltenen Nitrilgruppe liegt mit 2225 - 2250 cm<sup>-1</sup> im Raman-Spektrum deutlich außerhalb des üblichen Fingerprint-Bereichs von Peptiden, Cellulose oder organischen Polymeren wie dem Tonerpolymer und ermöglicht daher den eindeutigen Nachweis auf den jeweiligen Substraten. Es wurden anstelle des Cellulosepulvers einzelne Cellulosefasern verwendet, die durch mehrstündiges Aufweichen von Filterpapier in Wasser gewonnen werden konnten. Diese stellen als tatsächlicher Bestandteil des Papiers ein genaueres Modell als das Cellulosepulver dar. Die Cellulosefasern wurden analog zu den vorherigen Versuchen in Suspension mit <sup>CN</sup>CBP1 inkubiert, gewaschen und anschließend am Raman-Mikroskop untersucht. Es wurde ein Linienscan an einer dieser funktionalisierten Cellulosefasern durchgeführt. Anschließend kann durch die graphische Darstellung der Intensität einzelner Banden <sup>CN</sup>CBP1 auf der Cellulosefaser

nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 4.19). Dafür wurden die Intensitäten der starken Valenzschwingung der Ethergruppen zwischen  $1085 - 1104 \text{ cm}^{-1}$  für Cellulose und der Valenzschwingung der Nitrilgruppe zwischen  $2227 - 2243 \text{ cm}^{-1}$  für  $^{\text{CN}}\text{CBP1}$  über die Strecke des Linienscans untersucht.<sup>[260]</sup> In Abbildung 4.19 (c) ist ein Anstieg der Intensität der CN-Bande zur gleichen Zeit wie der Anstieg der Valenzschwingung der Ethergruppen der Cellulose deutlich erkennbar. Dies ist ein eindeutiger Nachweis, dass  $^{\text{CN}}\text{CBP1}$  auf der Cellulosefaser adsorbiert.

Der schwarze Toner konnte für Raman-Untersuchungen nicht verwendet werden, da er einen zu großen Anteil der Laserenergie absorbierte und dadurch lokal innerhalb weniger Sekunden aufgeschmolzen wurde. Daher wurde stattdessen das farblose, extrahierte Tonerpolymer eingesetzt, welches in den Fluoreszenzstudien bereits signifikante Wechselwirkungen mit TBP1 zeigte (vgl. Abbildung 4.16). Das Polymer wurde in THF gelöst und durch mehrfache Tauchbeschichtung wurde eine dünne Schicht auf ein Deckglas aufgetragen. Dieses wurde analog zu den vorherigen Untersuchungen in einer Lösung mit  $^{\text{CN}}\text{TBP1}$  inkubiert und anschließend mehrfach gewaschen. Danach wurde am Raman-Mikroskop ein Linienscan durch die Ebene der Toneroberfläche durchgeführt. Die Darstellung der Intensitäten der Schwingung der Nitrilgruppe und der Valenzschwingung der aromatischen Wasserstoffatome des Toners zwischen  $3050 - 3070 \text{ cm}^{-1}$  über den gemessenen Weg in Abbildung 4.19 (c) zeigt die Adsorption von  $^{\text{CN}}\text{TBP1}$  auf der Toneroberfläche. Der Anstieg der Intensität der CN-Bande zur gleichen Zeit wie der Anstieg der Schwingungsbande der aromatischen C-H-Bindungen ist der Nachweis für die erfolgreiche Funktionalisierung des Toners, auch wenn die Intensität der CN-Bande geringer ist als die der aromatischen C-H-Bindungen.





**Abbildung 4.19.** Raman-Mikroskopie inkubierter Substrate (links: Cellulose, rechts: Toner): a) Mikroskopie-Aufnahme einer Cellulosefaser bzw. einer Fläche des extrahierten Tonerpolymers auf einem Glaträger (graue Pfeile veranschaulichen die Messrichtung der durchgeführten Linienscans in x- bzw. z-Richtung), b) Raman-Spektrum des jeweiligen Substrats und Substrat-bindenden Peptids (Pfeile zeigen an, welche Bandenintensitäten im Linienscan integriert wurden), c) Intensität der angezeigten Banden über die Strecke der durchgeführten Linienscans.

## 4.4 Adsorptionsuntersuchungen an gedruckten Mustern

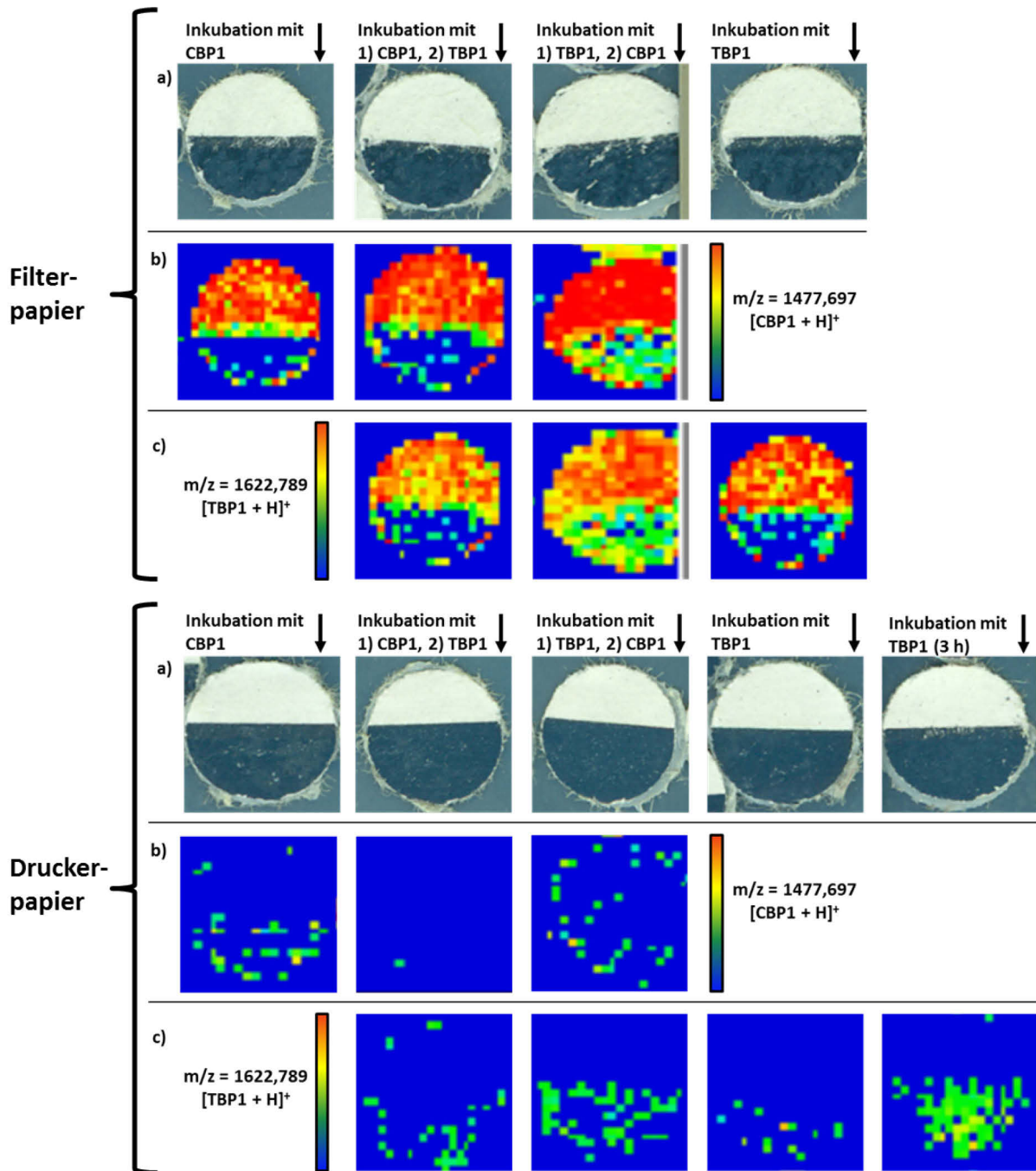
### 4.4.1 Optimierung der Inkubationsbedingungen durch bildgebende MALDI-TOF-MS-Messungen

Nachdem CBP1 und TBP1 jeweils die besten Ergebnisse bezüglich der Adsorptionsmenge und ihrer Kreuzspezifität an den einzelnen Substraten zeigten, wurden im Folgenden Experimente durchgeführt, um deren Adsorptionseigenschaften und vor allem ihre Kreuzspezifität an bedrucktem Papier zu untersuchen. Dafür wurden bildgebende MALDI-TOF-MS-Analysen an zur Hälfte bedrucktem und mit den Peptiden funktionalisiertem Papier durchgeführt. Es wurden Papierproben von 0,5 cm Durchmesser für jeweils 5 min mit wässrigen Peptidlösungen inkubiert

und nach mehrmaligem Waschen und anschließendem Trocknen mit beidseitigem Klebeband auf einem Objektträger fixiert. Dieser wurde in einen entsprechend angepassten Probenhalter eingespannt und mittels der Airbrush-Methode mit einer feinen Matrixschicht benetzt. Dabei verdampft das organische Lösungsmittel relativ schnell und ermöglicht somit ein Lösungsmittel-armes Auftragen der Matrix. Dieses Vorgehen verhindert, dass die Peptidbeschichtungen sich in der Matrixlösung wieder von der Substratoberfläche lösen können. Für eine bildgebende Messung wurden die Proben schließlich mit einem Laser in 100 µm bzw. 300 µm Schritten abgerastert, wobei in regelmäßigen Abständen ein eigenständiges Massenspektrum an jedem einzelnen Messpunkt entstand. Im Anschluss konnten Informationen über die räumliche Verteilung und Intensität einzelner Massen dargestellt werden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass die Peptide dafür nicht modifiziert werden müssen wie bspw. bei fluoreszenzbasierten Methoden. Abbildung 4.20 zeigt erste Untersuchungen von bedrucktem Filterpapier und zur Kontrolle auch von bedrucktem Druckerpapier, dass entweder nur mit CBP1 oder TBP1 in verdünntem TBST Puffer inkubiert wurde oder nacheinander mit beiden Peptiden.

Es zeigte sich, dass unter diesen anfangs verwendeten Bedingungen im TBST Puffer CBP1 auf Filterpapier ausreichend spezifisch an der Cellulose nachgewiesen werden konnte. Allerdings besaß TBP1 hier im Gegensatz zu den fluoreszenzbasierten Untersuchungen an den einzelnen Substraten überraschender Weise nicht die benötigte Spezifität zum Toner, sondern wurde ebenfalls zum Großteil auf der Cellulose nachgewiesen. Ein möglicher Grund hierfür kann der Fluoreszenzmarker Carboxyfluorescein sein. Dieser stellt eine relativ große hydrophobe Gruppe dar, welche in der Lage sein könnte, die Affinität zum hydrophoben Toner zu verstärken.

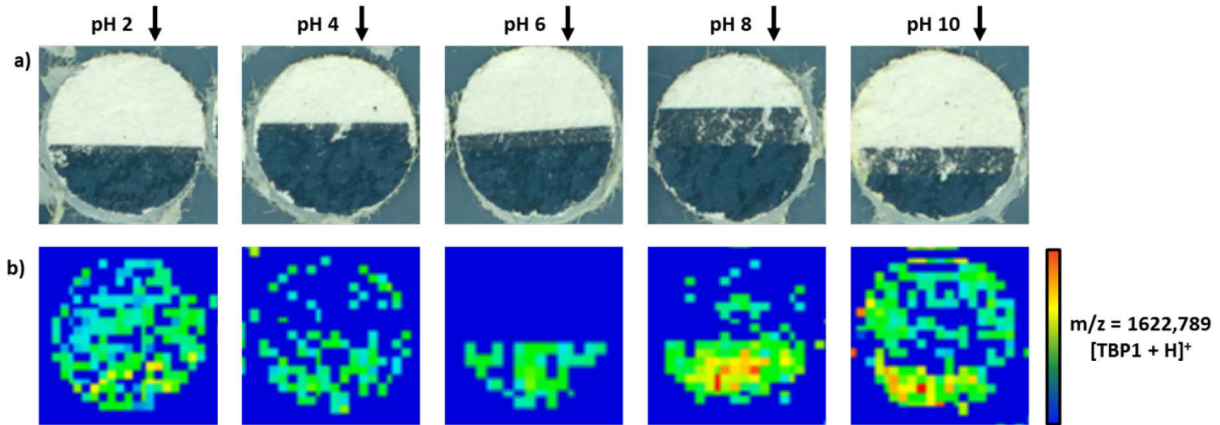
Im Gegensatz zum Filterpapier zeigte CBP1 auf Druckerpapier keine nennenswerte Adsorption. Dies bestätigt, dass die im Druckerpapier enthaltenen Füll- und Leimstoffe die Celluloseoberfläche effektiv modifizieren und diese vor den Peptiden abschirmen. TBP1 zeigte auf Druckerpapier zwar eine spezifische aber dafür relativ geringe Adsorption am Toner, die erst nach mehreren Stunden steigt.



**Abbildung 4.20.** Bildgebende MALDI-TOF-MS-Messungen von halbseitig schwarz bedrucktem Filterpapier (oben) bzw. Druckerpapier (unten), das entsprechend der Beschriftung entweder mit CBP1 oder TBP1 oder in angegebener Reihenfolge nacheinander mit beiden Peptiden inkubiert wurde: a) Bildaufnahmen der gemessenen Proben, b) Darstellung der Intensitätsverteilung von CBP1 mit  $m/z = 1477,697$   $[M+H]^+$ , c) Darstellung der Intensitätsverteilung von TBP1 mit  $m/z = 1622,789$   $[M+H]^+$ ; alle Muster messen 0,5 cm im Durchmesser; Auflösung: 300  $\mu m$  [Bedingungen: wenn nicht anders gekennzeichnet je 5 min Inkubation mit 0,1  $\mu M$  Peptidlösung in TBST Puffer (0,5 mmol, pH 7,5) gefolgt von 3 x je 2 min waschen in TBST Puffer].

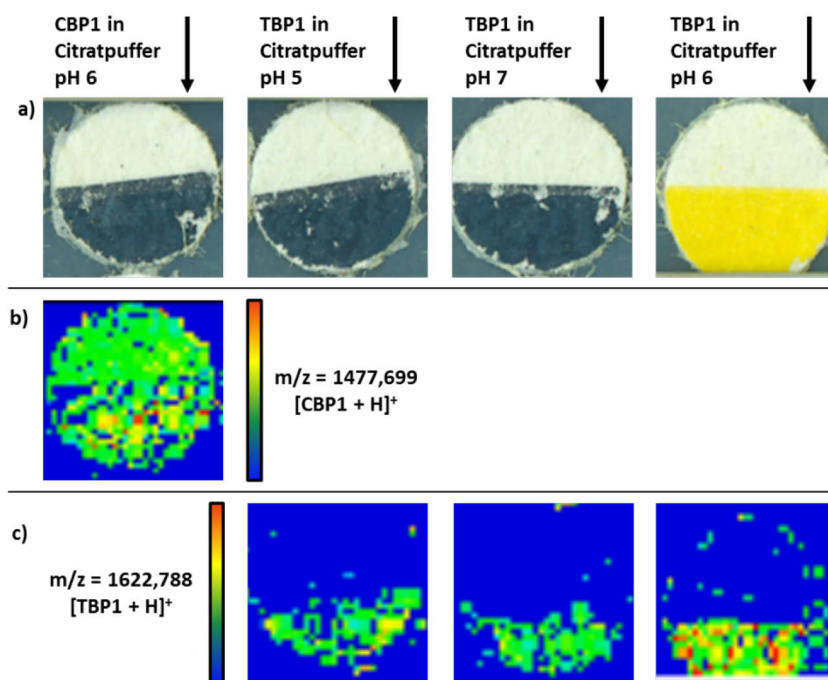
Da die Adsorption am Filterpapier deutlich stärker ausfiel, wurden die Inkubationsbedingungen an diesem Substrat in weiteren Untersuchungen optimiert, um eine möglichst kreuzspezifische Adsorption beider Peptide zu realisieren. Daher wurde die Affinität von TBP1 zum Toner auf

bedrucktem Filterpapier nun in biologischen Puffern bei verschiedenen pH-Werten getestet, um optimale Bedingungen zu finden. Abbildung 4.21 zeigt bildgebende MALDI-TOF-MS-Informationen von TBP1 auf bedrucktem Filterpapier bei unterschiedlichen pH-Werten in jeweils 50 mM Glycin-, Citrat- oder Phosphatpuffer.



**Abbildung 4.21.** Bildgebende MALDI-TOF-MS-Messungen von halbseitig schwarz bedrucktem und mit TBP1 inkubiertem Filterpapier: a) Bildaufnahme der gemessenen Proben, b) Darstellung der Intensitätsverteilung von TBP1 mit  $m/z = 1622,789$  ( $[M+H]^+$ ); alle Muster messen 0,5 cm im Durchmesser; Auflösung: 300  $\mu\text{m}$  [Bedingungen: je 5 min Inkubation mit 0,1  $\mu\text{M}$  Peptidlösung im jeweiligen Puffer gefolgt von 3 x je 2 min waschen im selben Puffer; pH 2 und pH 10: Glycin-Puffer (50 mM), pH 4 und pH 6: Citratpuffer (50 mM), pH 8 Phosphatpuffer (50 mM)].

Daraus ist ersichtlich, dass TBP1 vor allem bei pH 6 in Citratpuffer spezifisch auf dem Toner haftete, wohingegen bei den anderen untersuchten pH-Werten und Puffern weniger spezifische Verteilungen von TBP1 gefunden wurden. Daher wurden weitere Untersuchungen in Citratpuffer bei pH von 5 und 7 durchgeführt (vgl. Abbildung 4.21), um die Grenzen der spezifischen Adsorption in Bezug auf den pH-Wert zu analysieren. Diese bestätigen die spezifische Adsorption von TBP1 in Citratpuffer in einem pH-Bereich von 5 bis 7 nicht nur auf schwarzem Toner, sondern auch auf gelbem Toner. Letzterer bietet für spätere Untersuchungen unter einem Fluoreszenzmikroskop große Vorteile, da mit gelbem Toner deutlich bessere Ergebnisse möglich sind als mit schwarzem. Denn wegen der starken Absorption der Fluoreszenzstrahlung erschwert schwarzer Toner Fluoreszenz-Messungen erheblich. Weiterhin wurde untersucht, ob CBP1 unter diesen Bedingungen ebenfalls spezifisch auf der Cellulose adsorbiert. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4.22 zusammengefasst.



**Abbildung 4.22.** Bildgebende MALDI-TOF-MS-Messungen von halbseitig schwarz oder gelb bedrucktem und inkubiertem Filterpapier: a) Bildaufnahme der gemessenen Proben, b) Darstellung der Intensitätsverteilung von CBP1 mit  $m/z = 1477,699$  ( $[M+H]^+$ ), c) Darstellung der Intensitätsverteilung von TBP1 mit  $m/z = 1622,788$  ( $[M+H]^+$ ); alle Muster messen 0,5 mm im Durchmesser; Auflösung: 200  $\mu\text{m}$  [Bedingungen: je 5 min Inkubation mit 0,1  $\mu\text{M}$  Peptidlösung in Citratpuffer (50 mM) gefolgt von 3 x je 2 min waschen in Citratpuffer].

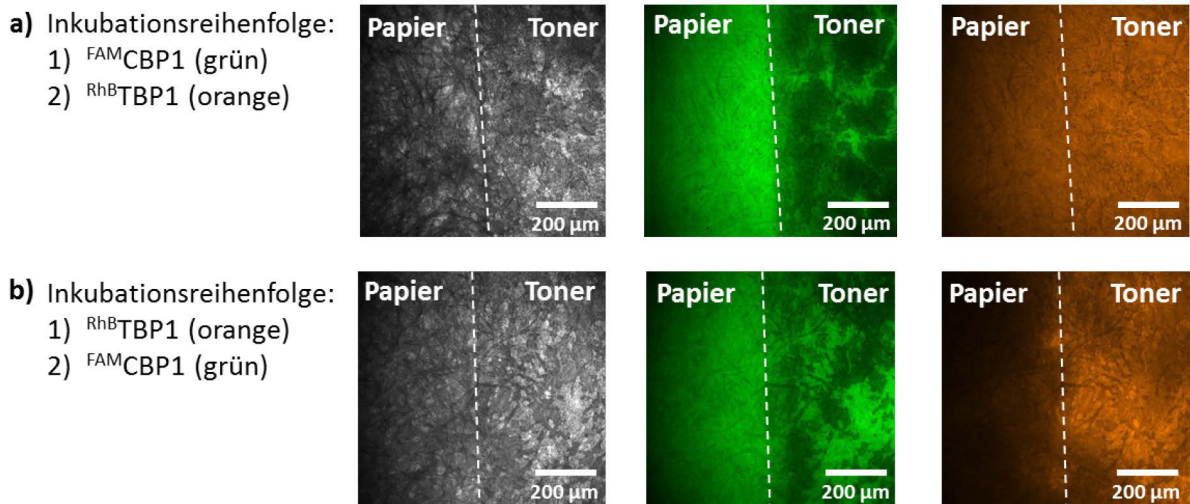
Es zeigte sich, dass CBP1 in Citratpuffer bei pH 6 nicht die gewünschte Spezifität aufwies. Daher musste ein Weg gefunden werden, beide Peptide in unterschiedlichen Puffern auf den jeweiligen Substratoberflächen zu fixieren ohne das jeweils andere Peptid dabei wieder abzulösen. Ein Lösungsansatz für dieses Problem wird in Kapitel 4.4.3 vorgestellt.

#### 4.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Ein entscheidender Schritt zum Erfolg der vorliegenden Arbeit ist die gleichzeitige Funktionalisierung von Toner und Cellulose in einem gedruckten Muster. Wie im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, adsorbierte TBP1 in Citratpuffer spezifisch am Toner, während CBP1 in TBST Puffer spezifisch an der Cellulose haftete. Dadurch entstand das Problem, dass zwei unterschiedliche Puffer eingesetzt werden mussten, in denen das jeweils andere Peptid nicht die notwendige Spezifität zum gewünschten Substrat aufwies. Erste Versuche, dieses Problem zu lösen, wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dafür wurde bedrucktes Filterpapier nacheinander mit beiden Peptiden in unterschiedlichen Puffern inkubiert (vgl. Abbildung 4.23). Um diese Untersuchungen mit beiden Peptiden gleichzeitig zu realisieren, wurde ein zweites Fluorophor eingeführt. Dieses musste in seinen Emissionseigenschaften vom FAM variieren. Der Farbstoff Rhodamin B mit einem Absorptionsmaximum bei 554 nm und einem



Emissionsmaximum bei 627 nm ist dafür bestens geeignet. Dieser wurde analog zum vorherigen Vorgehen *N*-terminal an TBP1 gekuppelt, um das fluoreszenzmarkierte  $^{RhB}$ TBP1 zu erhalten. Anschließend wurde halbseitig gelb bedrucktes Filterpapier nacheinander mit  $^{FAM}$ CBP1 in TBST und  $^{RhB}$ TBP1 in Citratpuffer bzw in umgekehrter Reihenfolge mit  $^{RhB}$ TBP1 in Citratpuffer und  $^{FAM}$ CBP1 in TBST inkubiert.



**Abbildung 4.23.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von halbseitig gelb bedrucktem Filterpapier nach der Inkubation mit a)  $^{FAM}$ CBP1 in TBST (0,5 mM, pH 7,5) und  $^{RhB}$ TBP1 in Citratpuffer (50 mM, pH 6,5) und b)  $^{RhB}$ TBP1 in Citratpuffer und  $^{FAM}$ CBP1 in TBST; es sind jeweils die Durchlichtaufnahmen (links) den Fluoreszenzaufnahmen im FAM-Kanal (mittig) bzw. RhB-Kanal (rechts) gegenüber gestellt; ein teilweises Abblättern des Toners nach mehreren Inkubations- und Waschschritten ist zu erkennen; weiß gestrichelte Linien verdeutlichen die Grenze zwischen Toner und Papier; [Bedingungen: 10 min Inkubation mit 1  $\mu$ M Stammlösung des ersten Peptids gefolgt von 3 Waschschritten für je 2 min im entsprechenden Puffer, danach 10 min Inkubation mit 1  $\mu$ M Stammlösung des zweiten Peptids gefolgt von 3 Waschschritten für je 2 min im entsprechenden Puffer].

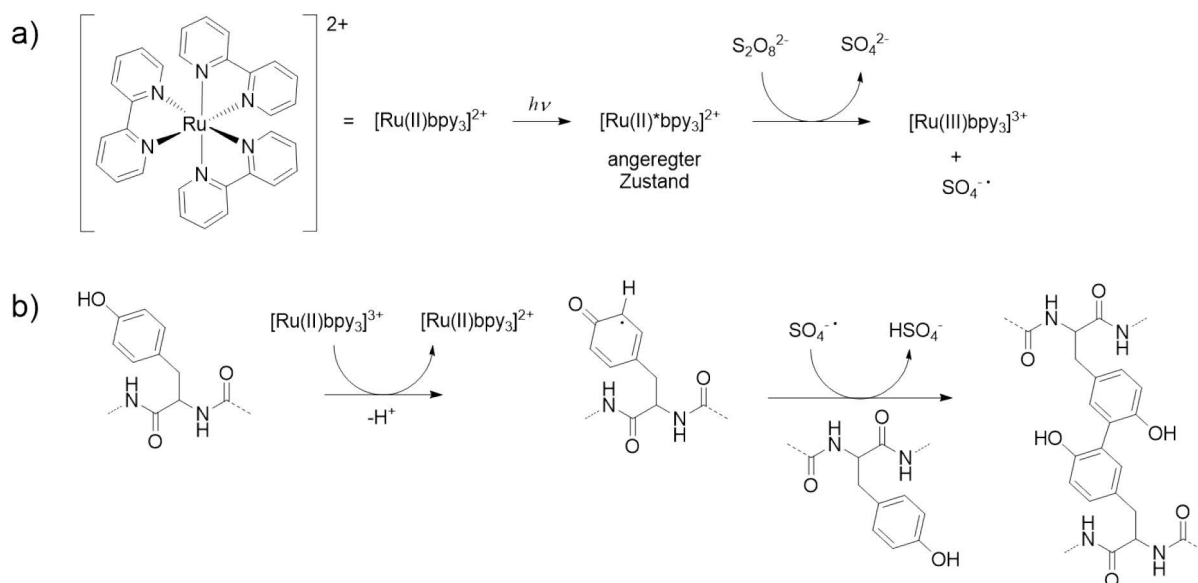
Abbildung 4.23 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen im FAM-Kanal (grün) und im RhB-Kanal (orange) nach der Inkubation mit beiden Peptiden in den jeweiligen optimierten Pufferlösungen. Zur Veranschaulichung sind die Bereiche von Papier und Toner entsprechend zugeordnet. Vor allem im FAM-Kanal sind einige Risse und Lücken im Toner sichtbar, in denen das mit  $^{FAM}$ CBP1 funktionalisierte Papier zu sehen ist. Diese Risse verdeutlichen, dass bei zu langen Inkubations- und Waschzeiten die Qualität der Tonermuster abnehmen kann. Um dem entgegenzuwirken, sollte die Behandlungsdauer der gedruckten Muster so kurz wie möglich gehalten werden und bei möglichst sanften Bewegungen der Inkubationsgefäße stattfinden. Abbildung 4.23 zeigt weiterhin, dass  $^{RhB}$ TBP1 unabhängig von der Inkubationsreihenfolge auch in die Struktur des Filterpapiers migrierte, während  $^{FAM}$ CBP1 ausschließlich auf der Cellulose des Filterpapiers haftete. Eine deutlich unspezifische Adsorption von  $^{RhB}$ TBP1 ist vor allem in Abbildung 4.23 a) zu beobachten. Dies legt nahe, dass nach der Inkubation der Cellulose mit  $^{FAM}$ CBP1 zu einem gewissen Grad

Peptid-Peptid-Wechselwirkungen zwischen  $^{RhB}$ TBP1 und  $^{FAM}$ CBP1 stattfinden könnten. Dadurch würde  $^{RhB}$ TBP1 nicht nur am Toner, sondern ebenfalls an der bereits funktionalisierten Cellulose adsorbieren.  $^{FAM}$ CBP1 adsorbiert hingegen auch nach der Funktionalisierung des Toners mit  $^{RhB}$ TBP1 spezifisch an den Cellulosefasern des Papiers.

Schließlich verdeutlichen diese Untersuchungen, dass ein anderer Weg gefunden werden musste, beide Peptide nacheinander in unterschiedlichen wässrigen Medien auf den gewünschten Substratoberflächen zu fixieren. Im folgenden Kapitel wird ein Lösungsansatz für dieses Problem vorgestellt.

#### 4.4.3 PICUP-Strategie zur Stabilisierung der Tonerbeschichtung

Die photo-induzierte Quervernetzung unmodifizierter Proteine, kurz PICUP (*photo-induced cross-linking of unmodified proteins*) bietet einen sehr vorteilhaften Weg, eine Peptidbeschichtung auf der Substratoberfläche zu stabilisieren. PICUP wurde ursprünglich entwickelt, um die Architektur von Proteinkomplexen zu untersuchen.<sup>[261, 262]</sup> Dabei bietet dieser Weg der Quervernetzung viele Vorteile gegenüber anderen Techniken. Er ist sehr schnell, erlaubt hohe Ausbeuten, kann durch Licht im sichtbaren Spektralbereich angeregt werden und benötigt keine künstliche Modifizierung der Proteine oder Peptide. Mechanistisch wird hierbei Ru(II) in einem Ruthenium(II)-tris-bipyridyldikation ( $[Ru(II)bpy_3]^{2+}$ ) photokatalytisch in Anwesenheit des Elektronenakzeptors Ammoniumpersulfat (APS) in Ru(III) umgewandelt. Dabei entsteht ein Sulfatradikal als potentieller Protonenakzeptor (vgl. Abbildung 4.24 a)). Ru(III) als starkes Einelektronenoxidanz kann nahe gelegene Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan oder Methionin oxidieren. Diese Oxidation ist relativ unspezifisch und kann auch andere Peptidgruppen betreffen. Dabei entsteht immer ein Peptidradikal, das über verschiedene intra- und intermolekulare Wege weiter reagieren kann. So kann ein entstandenes Tyrosinradikal bspw. über eine Arenkupplung mit einem weiteren Tyrosin reagieren (vgl. Abbildung 4.24 b)) oder mit einer nukleophilen Aminosäure wie bspw. Lysin oder Cystein. Denkbar ist auch eine Reaktion mit den Phenylgruppen des Poly(styrol-co-butylacrylats) des Tonerpolymers, wodurch die Peptidbeschichtung kovalent an der Toneroberfläche fixiert würde. Im Anschluss können durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms stabile Dimere entstehen oder die Radikale reagieren analog weiter zu Oligomeren, bevor ein Wasserstoffatom abstrahiert wird. Dieses kann schließlich bspw. durch das vorher entstandene Sulfatradikal abgefangen werden.



**Abbildung 4.24.** Schematische Darstellung der photo-induzierten Quervernetzung unmodifizierter Proteine (PICUP): a) photokatalytische Oxidation von  $[\text{Ru(II)bpy}_3]^{2+}$  zu  $[\text{Ru(III)bpy}_3]^{3+}$  mit einem Persulfatanion als Elektronenakzeptor und b) Entstehung eines möglichen Proteinradikals und ein möglicher Weg zur Quervernetzung mittels Arenkupplung.

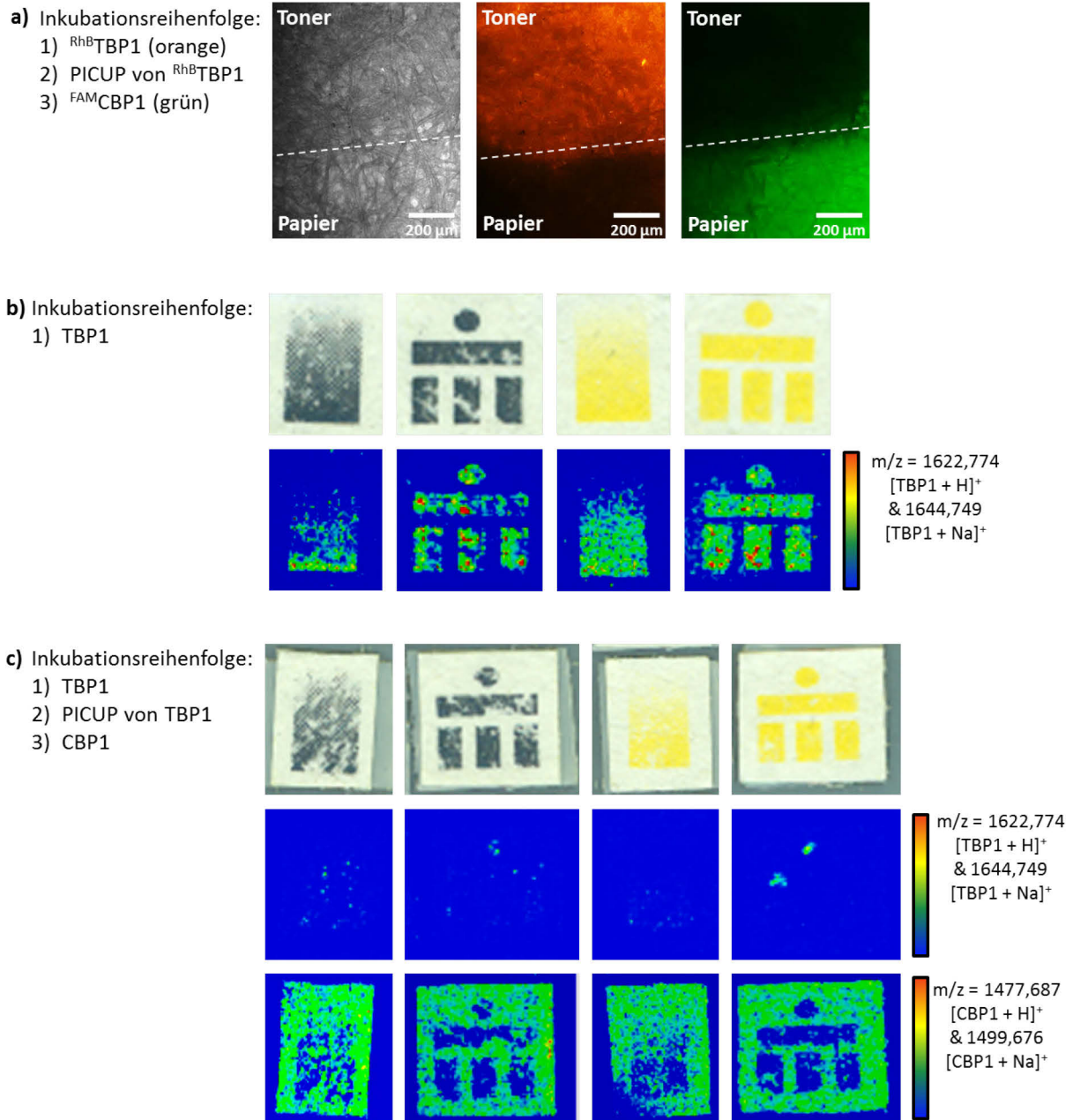
Diese Methode kann für verschiedene Peptide angewandt werden, da sie verschiedene Möglichkeiten zur Radikalbildung bietet. TBP1 besitzt bspw. zwei Tyrosine und ein Tryptophan. Wird also die Toneroberfläche mit TBP1 beschichtet, kann diese Beschichtung anschließend mittels PICUP stabilisiert werden, wobei einzelne Peptide kovalent miteinander und möglicherweise auch mit der Toneroberfläche vernetzt werden. Dadurch wird TBP1 in den folgenden Schritten der Funktionalisierung mit CBP1 nicht mehr vom Toner gewaschen, sondern bildet eine stabile Beschichtung der gewünschten Substratoberfläche. So wurde die gewünschte Funktionalisierung gedruckter Muster mit unterschiedlichen Peptiden auf Toner und Cellulose ermöglicht. Dies konnte sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch mittels bildgebender MALDI-TOF-MS-Untersuchungen nachgewiesen werden. Dafür wurden gedruckte Muster in Citratpuffer mit TBP1 inkubiert, anschließend wurde für wenige Sekunden die PICUP-Technik angewandt und die Muster wurden in TBST Puffer mit CBP1 inkubiert. Für die Quervernetzung mittels PICUP wurden 1 mM Lösungen von APS und Ruthenium(II)-tris(2,2'-bipyridyl)chlorid (Ru-bpy) verwendet. Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden wie zuvor die fluoreszenzmarkierten Peptide  $^{\text{RhB}}$ TBP1 und  $^{\text{FAM}}$ CBP1 verwendet, wohingegen für die MALDI-TOF-MS-Untersuchungen keine zusätzliche Funktionalisierung der Peptide notwendig war.

Abbildung 4.25 a) zeigt mittels Fluoreszenzmikroskopie nach dem oben beschriebenen Vorgehen deutlich eine erfolgreiche Beschichtung der Toneroberfläche mit  $^{\text{RhB}}$ TBP1 im RhB-Kanal (orange) und der Cellulose mit  $^{\text{FAM}}$ CBP1 im FAM-Kanal (grün). Dabei ist die Grenze zwischen



funktionalisiertem Toner und funktionalisierter Cellulose in beiden Fluoreszenzkanälen deutlich zu erkennen. Dies veranschaulicht die erfolgreiche Optimierung der Inkubationsbedingungen durch die Stabilisierung der Tonerbeschichtung mittels PICUP.

Abbildung 4.25 b) und c) zeigen bildgebende MALDI-TOF-MS-Studien an gedruckten Mustern und Gradienten mit schwarzem und gelbem Toner. In Abbildung 4.25 b) sind MALDI-Messungen nach der Inkubation mit TBP1 in Citratpuffer zu sehen. Die gewünschte Adsorption auf der Toneroberfläche ist deutlich erkennbar. Dies beweist, dass nicht nur die Funktionalisierung einfacher Tonerflächen mit TBP1 spezifisch ist, sondern auch komplizierte Muster spezifisch beschichtet werden können. Abbildung 4.25 c) zeigt MALDI-Messungen nach der Funktionalisierung mit TBP1 in Citratpuffer, der Stabilisierung der Tonerbeschichtung mittels PICUP und der anschließenden Funktionalisierung der Cellulose mit CBP1 in TBST Puffer. Diese Messungen zeigen eine deutliche Adsorption von CBP1 auf dem Papier, während kaum noch TBP1 auf dem Toner gemessen wurde. Dies bestätigt die erfolgreiche Quervernetzung von TBP1 zu größeren Oligomeren, welche mittels MALDI nicht desorbiert und daher auch nicht nachgewiesen werden können.



**Abbildung 4.25.** a) Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von halbseitig gelb bedrucktem Papier inkubiert mit  $\text{RhB-TBP1}$ , quervernetzt via PICUP und inkubiert mit  $\text{FAM-CBP1}$ : Durchlichtaufnahme (links) und Fluoreszenzaufnahmen im RhB-Kanal (mittig) bzw. im FAM-Kanal (rechts); b) & c) bildgebende MALDI-TOF-MS-Messungen: b) mit TBP1 inkubierte Proben als Bildaufnahmen (oben) und als Darstellung der Intensitätsverteilung von TBP1 (unten), c) mit TBP1 inkubierte, mittels PICUP quervernetzte und mit CBP1 inkubierte Proben als Bildaufnahmen (oben) und als Darstellung der Intensitätsverteilung von TBP1 (mittig) bzw. CBP1 (unten), Auflösung:  $100\mu\text{m}$ , Gradienten:  $0,25\text{ mm} \times 0,45\text{ mm}$ , Muster:  $0,35\text{ mm} \times 0,31\text{ mm}$  [Bedingungen: Inkubation mit  $\text{RhB-TBP1}$  bzw. TBP1 in Citratpuffer ( $50\text{ mM}$ ,  $\text{pH } 6,5$ ) für  $5\text{ min}$ , anschließend dreimaliges Waschen je  $2\text{ min}$  in Citratpuffer; Quervernetzt via PICUP mit  $25\text{ }\mu\text{L } 1\text{ mM APS}$  und  $25\text{ }\mu\text{L } 1\text{ mM Ru-bpy}$  in Citratpuffer für  $3\text{ s}$ , anschließend dreimaliges Waschen je  $2\text{ min}$  in Citratpuffer; Inkubation mit  $\text{FAM-CBP1}$  bzw. CBP1 in TBST ( $0,5\text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,5$ ) für  $5\text{ min}$ , anschließend dreimaliges Waschen je  $2\text{ min}$  in TBST].

Somit bestätigen diese Untersuchungen, dass eine geeignete Plattform geschaffen wurde, die Oberflächen von Papier und Toner selektiv und stabil zu beschichten. Der nächste Schritt ist die modelhafte Funktionalisierung gedruckter Muster, die in Kapitel 4.6 vorgestellt wird. Zuvor werden jedoch noch einige Untersuchungen vorgestellt, die dazu dienen sollen, die Wechselwirkungen zwischen CBP1 und der Cellulose bzw. TBP1 und dem Toner besser zu verstehen.

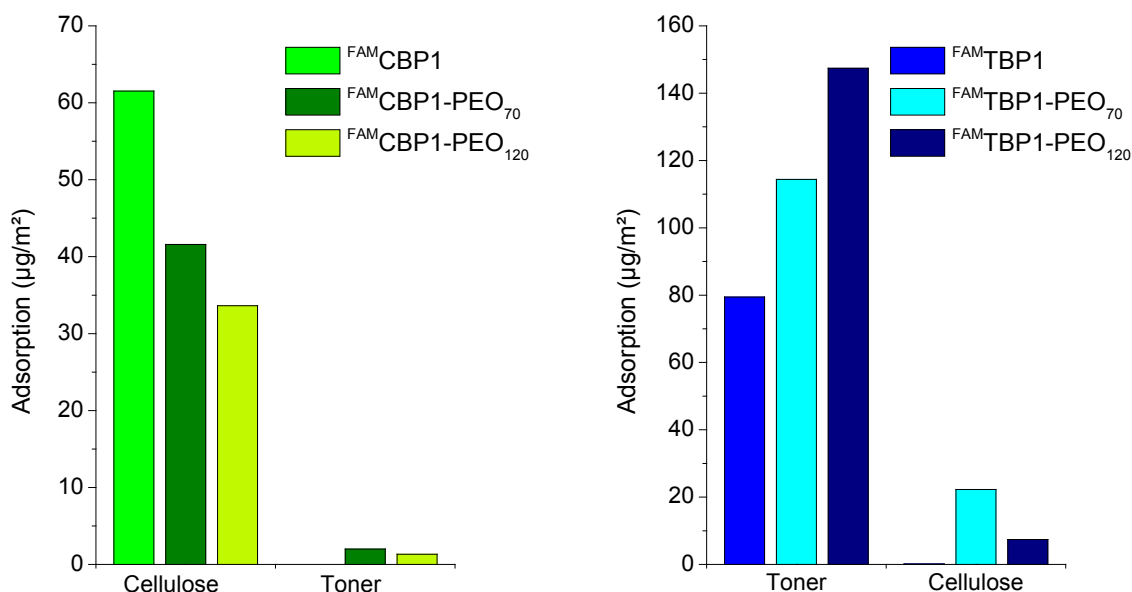
## **4.5 Erweiterte Adsorptionsuntersuchungen**

Nachdem nun die Adsorptionsbedingungen zur erfolgreichen Funktionalisierung bedruckten Papiers optimiert wurden, sollen im Folgenden weitere Untersuchungen an den einzelnen Substraten vorgestellt werden. Diese dienen dazu, die Wechselwirkungen zwischen beiden Peptiden und ihren jeweiligen Substraten unter den optimalen Bedingungen besser zu verstehen und zu charakterisieren. Dafür wurden alle folgenden Untersuchungen mit CBP1 weiterhin in TBST Puffer durchgeführt, während die Untersuchungen von TBP1 in Citratpuffer stattfanden.

### **4.5.1 Peptid-Polymer-Konjugate**

Es wurden C-terminal unterschiedlich lange Blöcke von Poly(ethylenoxid) (PEO) an CBP1 und TBP1 gekuppelt, um bei der Beschichtung die Ausbildung von Multischichten zu unterdrücken. Denn ähnliche Arbeiten zeigten, dass solche PEO-Blöcke die Ausbildung von Mehrfachschichten auf der Substratoberfläche verhindern können und zur Ausbildung von Monoschichten führen.<sup>[102]</sup> Vergleichende Adsorptionsuntersuchungen zwischen Konjugaten und Peptiden sollen dabei helfen, die Wechselwirkungen der Sequenzen mit den Substrate besser zu verstehen. Die PEO-Blöcke sind außerdem ein gutes Modell für andere funktionstragende Einheiten und haben verschiedene Vorteile wie ihre gute Löslichkeit in wässrigen Systemen, ihre Biokompatibilität und wenige zu erwartende Wechselwirkungen mit den Substratoberflächen. Der PEO-Block wurde C-terminal an die Peptide geknüpft, indem die Peptidsynthese an einem vorbeladenem TentaGel PAP® Harz durchgeführt wurde. Die Länge der PEO-Blöcke wird durch den Polymerisationsgrad DP=70 oder DP=120 bestimmt, der im Folgenden tiefgestellt angezeigt wird (PEO<sub>70</sub> oder PEO<sub>120</sub>). Zur Untersuchung der Adsorptionseigenschaften auf den Substratoberflächen wurde erneut die Fluoreszenzspektroskopie genutzt. Es wurden analog zu Kapitel 4.3.1.2 Adsorptionsuntersuchungen durchgeführt. Dafür wurden die einzelnen Substrate mit wässrigen Lösungen der jeweiligen Peptid-Polymer-Konjugate in den optimierten Puffern inkubiert und anschließend mit diesen mehrfach gewaschen, um die Stabilität der Beschichtung zu überprüfen. Um die Adsorptionswerte von Peptiden und Konjugaten unterschiedlicher molarer

Massen vergleichen zu können, wurden in Abbildung 4.26 spezifische Adsorptionswerte in  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  bezogen auf die BET-Oberflächen der Substrate angegeben. Zusätzlich wurden in Tabelle 4.10 die Adsorptionswerte in  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  und  $\text{nmol}/\text{m}^2$  gegenübergestellt.



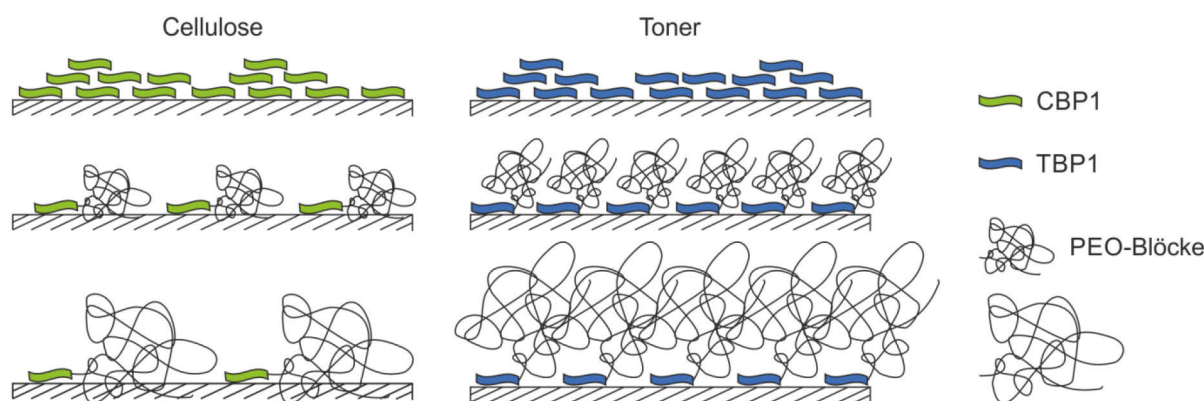
**Abbildung 4.26.** Vergleich der Adsorption von Peptiden und Konjugaten an den jeweiligen Substraten: Adsorption in  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  nach 10 min Inkubation mit 1 mL einer 1  $\mu\text{M}$  Stammlösung und 3 Waschschritten im jeweiligen Puffer ( $^{\text{FAM}}\text{CBP1}$  und entsprechende Konjugate in TBST (0,5 mM, pH 7,5),  $^{\text{FAM}}\text{TBP1}$  und entsprechende Konjugate in Citratpuffer (50 mM, pH 6,5)).

**Tabelle 4.10.** Vergleich der Adsorptionswerte von Peptiden und Konjugaten an den jeweiligen Substraten in  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  und  $\text{nmol}/\text{m}^2$  [Bedingungen: 10 min Inkubation mit 1 mL einer 1  $\mu\text{M}$  Stammlösung und 3 Waschschritten im jeweiligen Puffer ( $^{\text{FAM}}\text{CBP1}$  und entsprechende Konjugate in TBST (0,5 mM, pH 7,5),  $^{\text{FAM}}\text{TBP1}$  und entsprechende Konjugate in Citratpuffer (50 mM, pH 6,5))].

Adsorption am Substrat		$^{\text{FAM}}\text{CBP1}$	$^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{70}$	$^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{120}$	$^{\text{FAM}}\text{TBP1}$	$^{\text{FAM}}\text{TBP1-PEO}_{70}$	$^{\text{FAM}}\text{TBP1-PEO}_{120}$
Toner:	$\mu\text{g}/\text{m}^2$	0	2	1	79	114	147
	$\text{nmol}/\text{m}^2$	0	0	0	40	23	20
Cellulose:	$\mu\text{g}/\text{m}^2$	62	42	34	1	22	7
	$\text{nmol}/\text{m}^2$	33	9	5	0	4	1

Abbildung 4.26 zeigt, dass sowohl beide Peptide  $^{\text{FAM}}\text{CBP1}$  und  $^{\text{FAM}}\text{TBP1}$  als auch ihre Konjugate eine gute Spezifität gegenüber dem gewünschten Substrat aufwiesen. Bei den Konjugaten  $^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{70}$  und  $^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{120}$  ist auf der Celluloseoberfläche mit steigender Molekülgröße eine geringere Adsorption zu beobachten. In Tabelle 4.10 ist der gleiche Effekt bezogen auf die spezifische Masse und auch die spezifische Stoffmenge zu beobachten. Dies ist

entsprechend der zunehmenden Größe der Konjugate und dem dadurch steigenden Platzbedarf auf der Oberfläche zu erwarten. Erstaunlicherweise zeigt sich dieser Trend nicht sofort bei den Konjugaten  $^{FAM}TBP1-PEO_{70}$  und  $^{FAM}TBP1-PEO_{120}$ . Bei diesen wurde bezogen auf die spezifische Masse der auf der Toneroberfläche adsorbierten Konjugate ein gegenteiliger Effekt beobachtet, da die adsorbierte Menge mit steigendem Polymerisationsgrad des PEO zunimmt (vgl. Abbildung 4.26). Allerdings sinkt auch hier die spezifische Stoffmenge der auf der Toneroberfläche adsorbierten Konjugate mit steigender PEO Länge (vgl. Tabelle 4.10). Dies scheint darauf hinzudeuten, dass auf dem Toner höhere Benetzungsdichten vorliegen als auf der Cellulose. Möglicherweise ordnen sich die Konjugate auf der Celluloseoberfläche gleichmäßiger an. Denn hier können bspw. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen PEO-Block und Cellulose ausgebildet werden. Dagegen orientieren sich die PEO-Einheiten auf dem Toner wahrscheinlich von der Oberfläche weg (vgl. Abbildung 4.27). Dadurch würden auf der Cellulose und auf dem Toner unterschiedliche Benetzungsdichten vorkommen. Dies würde auch erklären, dass  $^{FAM}TBP1-PEO_{70}$  und  $^{FAM}TBP1-PEO_{120}$  etwas mehr auf der Celluloseoberfläche haften als  $^{FAM}CBP1-PEO_{70}$  und  $^{FAM}CBP1-PEO_{120}$  auf der Toneroberfläche.



**Abbildung 4.27.** Schematisch stark vereinfachtes Modell des unterschiedlichen Adsorptionsverhaltens der PEO-Konjugate ausgehend von CBP1 und TBP1: Hydrophile Wechselwirkungen zwischen Cellulose und PEO-Block führen zu größerer Flächenabdeckung pro Molekül mit steigender PEO-Länge; abstoßende Wechselwirkungen zwischen Toner und PEO-Block wirken einer größer werdenden Flächenabdeckung pro Molekül entgegen, da PEO-Einheiten sich weg von der Oberfläche ausrichten.

Diese Untersuchungen verdeutlichen erneut die Spezifität der selektierten Peptide zu ihren jeweiligen Substraten und zeigen weiterhin, dass die diese auch nach der Kupplung anderer funktionaler Einheit erhalten bleibt.

#### 4.5.2 Sequenzabhängigkeit der Adsorption zu den Substraten

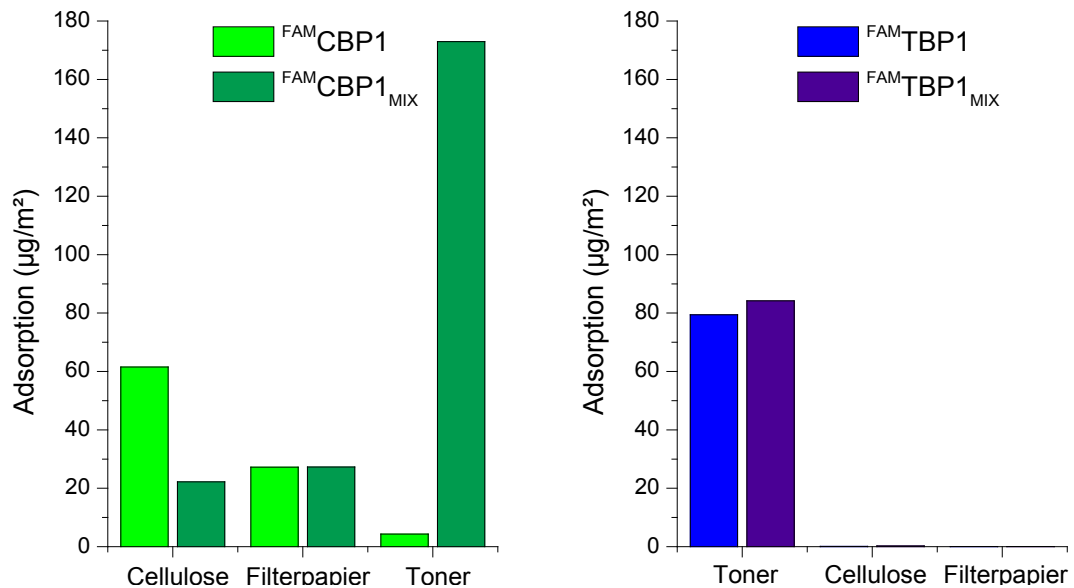
Um die Bedeutung der Peptidsequenz für die Spezifität der Adsorption auf den Substraten zu analysieren, wurden analog zum vorherigen Vorgehen verschiedene fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Für erste Untersuchungen zur Sequenzabhängigkeit wurde die Adsorption der selektierten Peptidsequenzen mit der Adsorption durchmischter Variationen dieser Peptide verglichen. Dies ist eine gängige Methode, die Sequenzabhängigkeit zu untersuchen. Dabei bleiben alle ursprünglich in der Sequenz enthaltenen Aminosäuren erhalten, werden aber nach einem Zufallsprinzip neu angeordnet.

**Tabelle 4.11.** Gegenüberstellung der mittels Phagen-Display selektierten Peptidsequenzen und ihrer durchmischten Varianten.

Sequenz	Bezeichnung
MHPNAGHGSLMR	CBP1
GPMSRHNMLHAG	CBP1 <sub>MIX</sub>
SGVYKVAYDWQH	TBP1
DVSYQAHYWVGK	TBP1 <sub>MIX</sub>

Zusätzlich zur mikrokristallinen Cellulose aus den vorherigen Versuchen wurde an dieser Stelle auch die Adsorption an Filterpapier untersucht, in dem die Cellulose in einer Faserstruktur vorliegt. Die Adsorptionswerte sind erneut in  $\mu\text{g}$  Peptid pro  $\text{m}^2$  Substrat angegeben.

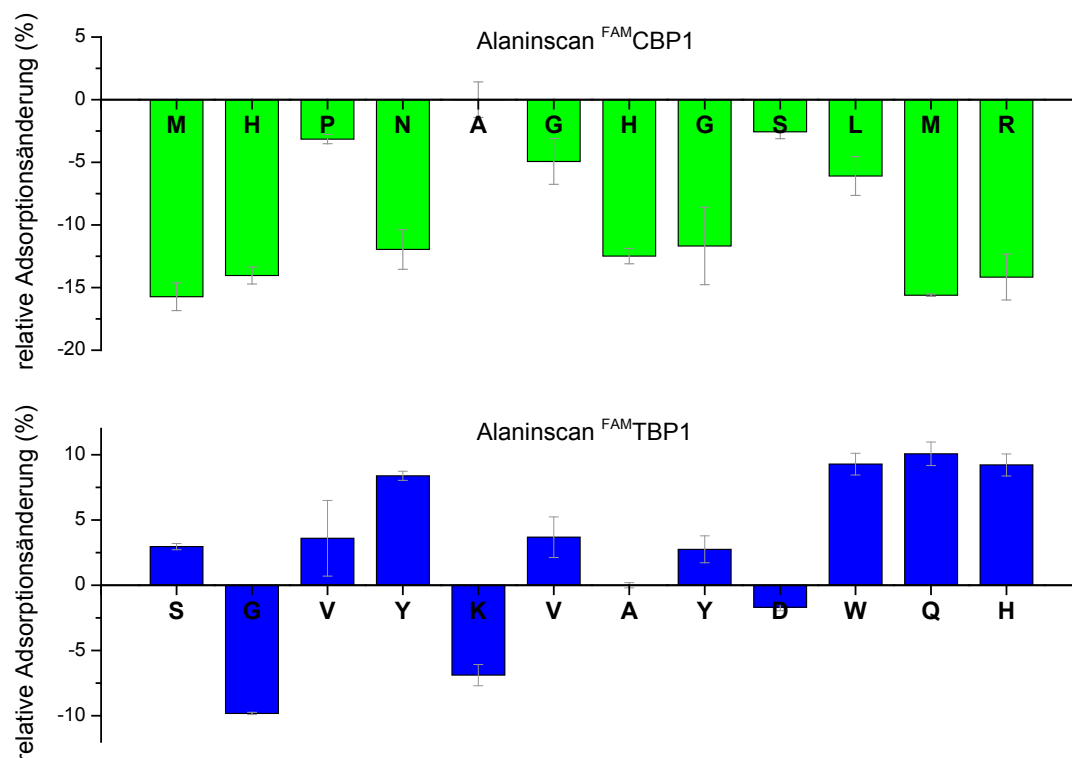


**Abbildung 4.28.** Vergleich der Adsorptionswerte der Peptide und ihrer durchmischten Varianten in  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  an den jeweiligen Substraten [Bedingungen: 50 mg Substrat, 10 min Inkubation mit 1 mL einer  $1 \mu\text{M}$  Stammlösung, dreimaliges Waschen für je 2 min im entsprechenden Puffer ( $^{\text{FAM}}\text{CBP1}$  und  $^{\text{FAM}}\text{CBP1}_{\text{MIX}}$  in TBST (0,5 mmol, pH 7,5),  $^{\text{FAM}}\text{TBP1}$  und  $^{\text{FAM}}\text{TBP1}_{\text{MIX}}$  in Citratpuffer (50 mM, pH 6,5)].

Abbildung 4.28 zeigt, dass beide durchmischten Varianten  $^{\text{FAM}}\text{CBP1}_{\text{MIX}}$  und  $^{\text{FAM}}\text{TBP1}_{\text{MIX}}$  noch auf den ursprünglichen Substraten adsorbierten, wobei  $^{\text{FAM}}\text{CBP1}_{\text{MIX}}$  weniger am Cellulosepulver haftet als die ursprüngliche Sequenz. Interessant ist, dass  $^{\text{FAM}}\text{CBP1}_{\text{MIX}}$  die Spezifität im Vergleich zur ursprünglichen Sequenz verloren hat und mit ca.  $170 \mu\text{g}/\text{m}^2$  mehr am Toner als an der Cellulose adsorbierte. Möglicherweise wurden in diesem Fall dickere Multischichten auf der Toneroberfläche ausgebildet.  $^{\text{FAM}}\text{TBP1}_{\text{MIX}}$  zeigt dagegen weiterhin eine sehr gute Spezifität zum Toner. Diese Untersuchung zeigt, dass die Sequenz der 12-mer Peptide sehr entscheidend für ihre spezifische Adsorption zu einem Substrat sein kann. Allerdings veranschaulichen sie auch, dass eine zufällige Durchmischung der enthaltenen Aminosäuren nicht zwangsläufig zu einer Änderung der Adsorptionseigenschaften führen muss, da die Aminosäure-Zusammensetzung ebenfalls Einfluss hat.

Um zusätzliche Aussagen darüber treffen zu können, wie wichtig die Sequenz für die Adsorption zum gewünschten Substrat ist, wird im Folgenden eine einfachere Methode erläutert, um zu untersuchen, welche Aminosäuren für die Adsorption zum Substrat besonders entscheidend sind. Diese gängige Methode zur Bestimmung der für die Wechselwirkungen wichtigen Aminosäuren innerhalb einer Peptidsequenz ist der sogenannte Alanin-Scan. Dabei wird jeweils eine Aminosäure innerhalb der Sequenz gegen die relativ unspezifische Aminosäure Alanin ausgetauscht. Dies wird an jeder Position der 12-mer Sequenz wiederholt. Anschließend werden die Adsorptionseigenschaften der modifizierten Peptide zum Substrat untersucht. Verschlechtert

sich die Adsorption im Vergleich zu den Werten der ursprünglichen Peptidsequenz, so kann davon ausgegangen werden, dass die ausgetauschte Aminosäure einen wichtigen Anteil zur Adsorption am Substrat hat. Sowohl für CBP1 als auch für TBP1 wurde ein Alanin-Scan durchgeführt. Wie bereits zuvor wurden hier die Peptide als Konjugate eingesetzt, um der Ausbildung von Multischichten entgegen zu wirken.

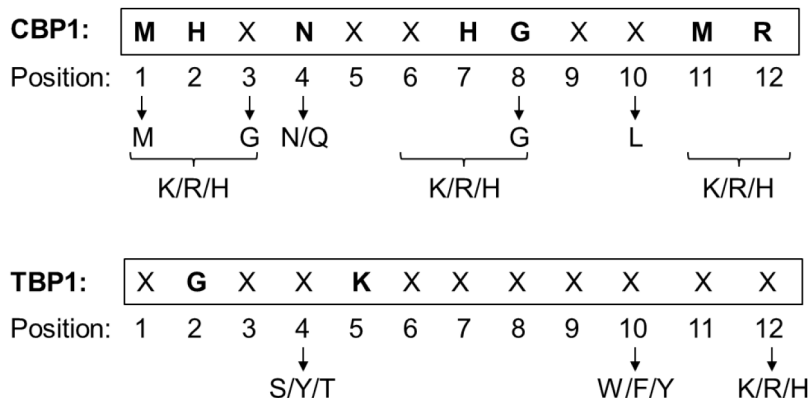


**Abbildung 4.29.** Zusammenfassung der Alaninscans von  $\text{FAM}^{\text{CBP1}}$  an Cellulosepulver (oben) und  $\text{FAM}^{\text{TBP1}}$  an Toner (unten): Adsorptionswerte sind prozentual im Vergleich zur Adsorption der ursprünglichen Sequenzen dargestellt [Bedingungen: 50 mg Substrat, 10 min Inkubation mit 1 mL einer 1  $\mu\text{M}$  Peptidlösung im entsprechenden Puffer (Variationen von  $\text{FAM}^{\text{CBP1}}$  in TBST (0,5 mmol, pH 7,5), Variationen von  $\text{FAM}^{\text{TBP1}}$  in Citratpuffer (50 mM, pH 6,5)].

In Abbildung 4.29 sind beide Alaninscans für  $\text{FAM}^{\text{CBP1}}$  und  $\text{FAM}^{\text{TBP1}}$  zusammengefasst. Es zeigte sich, dass im Fall von CBP1 der Austausch jeder einzelnen Aminosäure zu einer Verringerung der Adsorptionsmenge auf Cellulose führte. Dies legt ebenso wie die Adsorptionswerte der durchmischten Sequenz nahe, dass CBP1 sehr spezifisch an der Cellulose haftet. Besonders negativ fällt der Austausch der basischen Aminosäuren  $\text{H}^2$  und  $\text{H}^7$  und  $\text{R}^{12}$  sowie der schwefelhaltigen Aminosäuren  $\text{M}^1$  und  $\text{M}^{11}$  auf. Weiterhin zeigte sich, dass auch  $\text{N}^4$  und  $\text{G}^8$  einen entscheidenden Teil zur Adsorption an Cellulose beitragen. Im Vergleich zu den in Kapitel 4.2.2 ermittelten auffälligen Häufigkeiten bestimmter AS an bestimmten Positionen innerhalb der Peptidsequenz zeigten sich hier bemerkenswerte Übereinstimmungen zu diesen Ergebnissen (vgl. Abbildung 4.30). Besonders entscheidend für die Adsorption an Cellulose



scheinen Wasserstoffbrückenbindungen zu basischen Aminosäuren, eine erhöhte Flexibilität der Sequenz durch Glycine und Wechselwirkungen mit Methionin zu sein. Letztere lassen sich möglicherweise durch schwache Wasserstoffbrückenbindungen der Cellulose zu den freien Elektronenpaaren des Schwefels erklären.



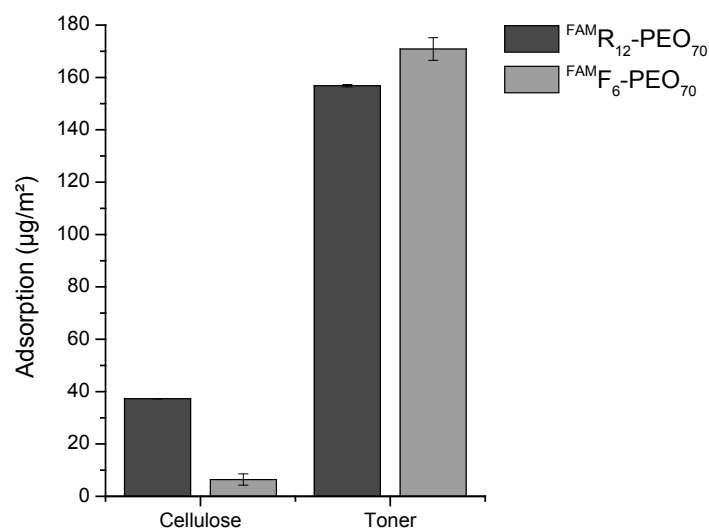
**Abbildung 4.30.** Gegenüberstellung der im Alaninscan ermittelten wichtigsten Aminosäuren (eingerahmt und fett hervorgehoben) und auffälliger Häufigkeiten bestimmter Aminosäuren an bestimmten Positionen nach statistischer Auswertung aller im Phagen-Display erhaltenen Sequenzen für CBP1 (oben) und TBP1 (unten).

Im Fall von TBP1 führte nur der Austausch weniger Aminosäuren zu einer nennenswerten Verringerung der Adsorption am Toner. Dies steht in Analogie zu der geringen Adsorptionsänderung im Vergleich von TBP1 und TBP1<sub>MIX</sub>. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TBP1 zwar keine außergewöhnlich starke Toner-bindende Sequenz darstellt, aber trotzdem die für das Gelingen der vorliegenden Arbeit entscheidende Spezifität aufweist. Eine entscheidende Adsorptionsänderung von TBP1 zum Toner zeigte sich beim Austausch von G<sup>2</sup> und K<sup>5</sup>. Interessant ist, dass die basische Aminosäure K<sup>5</sup> wichtig für die Adsorption zum Toner ist, während der Austausch der ebenfalls basischen endständigen Aminosäure H<sup>12</sup> sogar zu einer deutlichen Erhöhung der Adsorption führte. Dies verdeutlicht erneut, dass nicht nur die Funktionalität einer einzelnen Aminosäure entscheidend für die spezifische Bindung zu einem Substrat ist, sondern vor allem die Position innerhalb einer Sequenz. Ähnliches fällt im Alaninscan von CBP1 bei den Aminosäuren G<sup>6</sup> und G<sup>8</sup> auf. Führt der Austausch von Glycin mit der nur geringfügig unterschiedlichen Aminosäure Alanin zu einer deutlichen Verringerung der Adsorption an einem Substrat, so spricht dies dafür, dass eine gewisse Flexibilität der Peptidsequenz an dieser Stelle möglicherweise entscheidend für die Wechselwirkung mit dem Substrat ist. Da ansonsten keine nennenswerten Verschlechterungen der Adsorptionswerte von TBP1 beim Austausch einzelner AS durch Alanin festgestellt wurden, bleibt zu vermuten, dass hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen für die Adsorption am Toner entscheidend sind. Diese treten schließlich auch zum Alanin selbst auf.

Zusammenfassend verdeutlichen die Untersuchungen in diesem Kapitel, dass sowohl TBP1 als auch CBP1 die für diese Arbeit entscheidende Spezifität zu ihrem jeweiligen Substrat besitzen und vor allem die Peptidsequenz von CBP1 ausschlaggebend für diese Spezifität ist. Weiterhin bestätigten die Ergebnisse, dass sich das Phagen-Display zur Selektion einer guten Cellulose-bindenden Sequenz sehr gut eignete, während die selektierte Toner-bindende Sequenz nur eine geringe Sequenzabhängigkeit ihrer Adsorption zeigte.

### 4.5.3 Modell-Konjugate

Schließlich wurden Negativ-Kontrollen mit Modell-Peptiden bestehend aus einzelnen Aminosäuren durchgeführt. Es ist bekannt, dass kationische Funktionen entscheidend sind, um Wechselwirkungen mit Cellulose zu generieren wie sie bspw. in der Papierherstellung bei Retentionsmitteln auf Basis von Poly(ethylenimin) genutzt werden.<sup>[263]</sup> Daher wurden die Adsorptionseigenschaften eines reinen Arginin 12-mers als Model eines Cellulosebinders an beiden Substraten untersucht. Als Model eines Tonerbinders wurde ein Phenylalanin 6-mer ausgewählt, da Wechselwirkungen zu den  $\pi$ -Systemen des Poly(styrol-*co*-butylacrylats) sehr wahrscheinlich sind. Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurden beide Kontrollpeptide als PEO-Konjugate synthetisiert. Daher wurde ebenfalls lediglich ein Phenylalanin 6-mer anstatt eines 12-mers hergestellt.



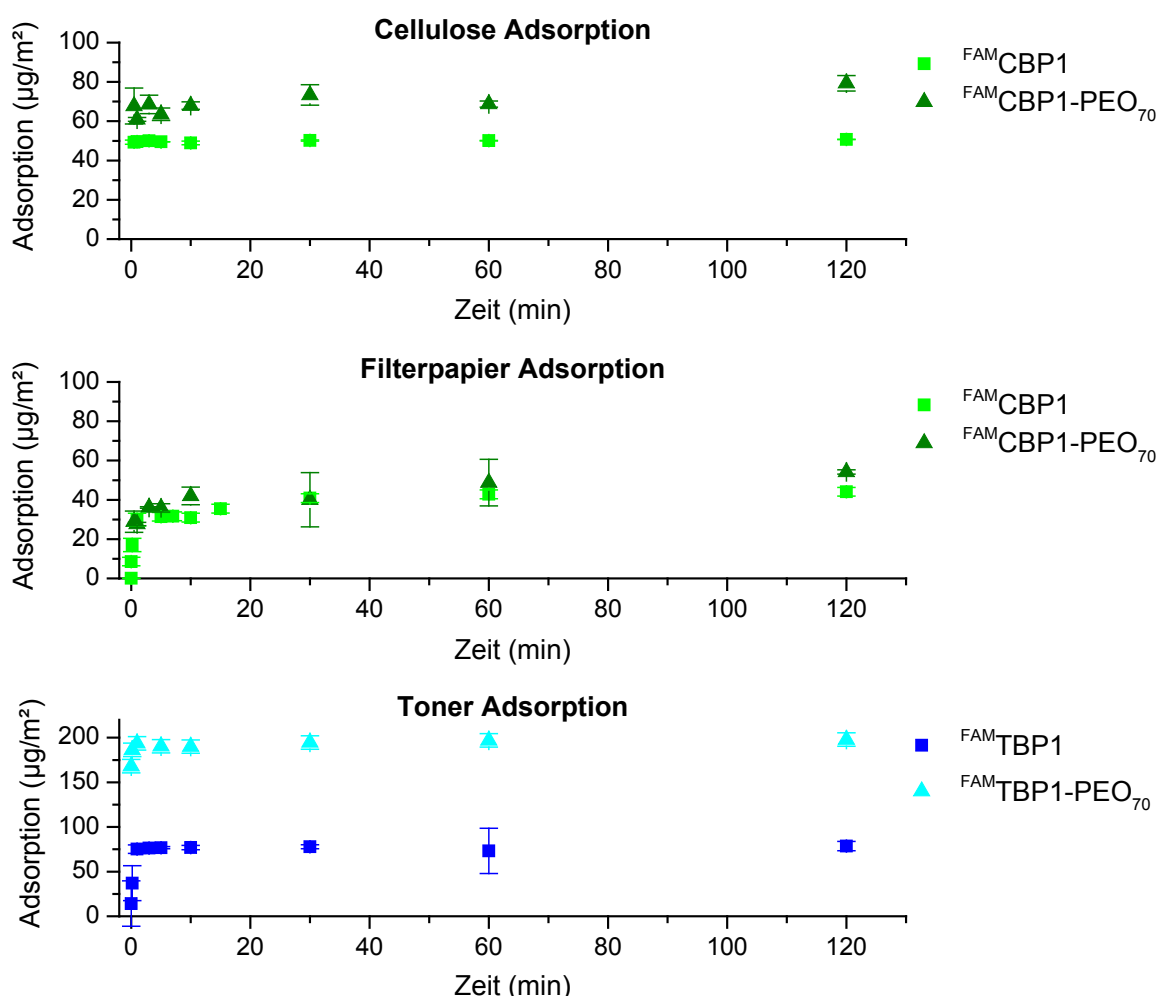
**Abbildung 4.31.** Vergleich der relativen Adsorptionswerte in µg Peptid bzw. Konjugat pro m² Substratoberfläche von  $^{FAM}R_{12}$ -PEO<sub>70</sub> und  $^{FAM}F_6$ -PEO<sub>70</sub> an Cellulose und Toner [Bedingungen: 50 mg Substrat, 10 min Inkubation mit 1 mL einer 1 µM Stammlösung, dreimaliges Waschen für je 2 min, alle Untersuchungen in TBST (0,5 mmol, pH 7,5)].

Abbildung 4.31 zeigt, dass beide Kontrollkonjugate am jeweiligen Substrat adsorbierten.  $^{FAM}R_{12}$ -PEO<sub>70</sub> haftete allerdings auch unspezifisch am Toner, während  $^{FAM}F_6$ -PEO<sub>70</sub> nur geringfügig an

der Cellulose adsorbierte. Diese Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung einer spezifischen Sequenz zur Generierung selektiver Beschichtungen.

#### 4.5.4 Bindungskinetiken an den Substraten

Um die Adsorption der Peptide genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich Bindungskinetiken an den einzelnen Substraten durchgeführt. Dafür wurden diese unterschiedlich lange mit Lösungen der fluoreszenzmarkierten Peptide inkubiert und die initial gebundene Menge Peptid indirekt mit der Fluoreszenzspektroskopie analog zu vorherigen Adsorptionsexperimenten gemessen.



**Abbildung 4.32.** Adsorptionskinetiken von Peptiden und Konjugaten: initiale Adsorption in µg/m² nach variierender Inkubationszeit von 10 mg Cellulose, 10 mg Filterpapier bzw. 25 mg Toner mit 300 µL einer 1 µM Stammlösung im entsprechenden Puffer (Cellulose und Filterpapier Adsorption in TBST (0,5 mmol, pH 7,5), Toner Adsorption in Citratpuffer (50 mM, pH 6,5)).

Sowohl am Cellulosepulver als auch am Toner ist die maximale Peptidkonzentration an der Substratoberfläche bereits nach wenigen Minuten erreicht, im Fall von FAM-CBP1 sogar nach wenigen Sekunden. Auch die C-terminale Funktionalisierung mit PEO ändert nur wenig an der

schnellen Sättigung von Cellulosepulver und Toner. Etwas langsamer verläuft die Sättigung vom Filterpapier mit <sup>FAM</sup>CBP1 und <sup>FAM</sup>CBP1-PEO<sub>70</sub>. Dies ist allerdings auch zu erwarten, da die Peptide und Konjugate teilweise in die Zwischenräume zwischen den einzelnen Cellulosefasern hindiffundieren, was einige Minuten mehr in Anspruch nehmen könnte. Diese Daten veranschaulichen zusätzlich die hohe Qualität der selektierten Sequenzen. Weiterhin bestätigen sie, dass kurze Inkubationszeiten von wenigen Minuten für eine erfolgreiche Inkubation der Substrate ausreichend sind. Dies kann im Hinblick auf spätere Anwendungen von Bedeutung sein, wenn schnelle Methoden zur Herstellung funktionaler Materialien gefordert sind.

#### 4.5.5 Bindungsstudien mittels Langmuir-Isothermen

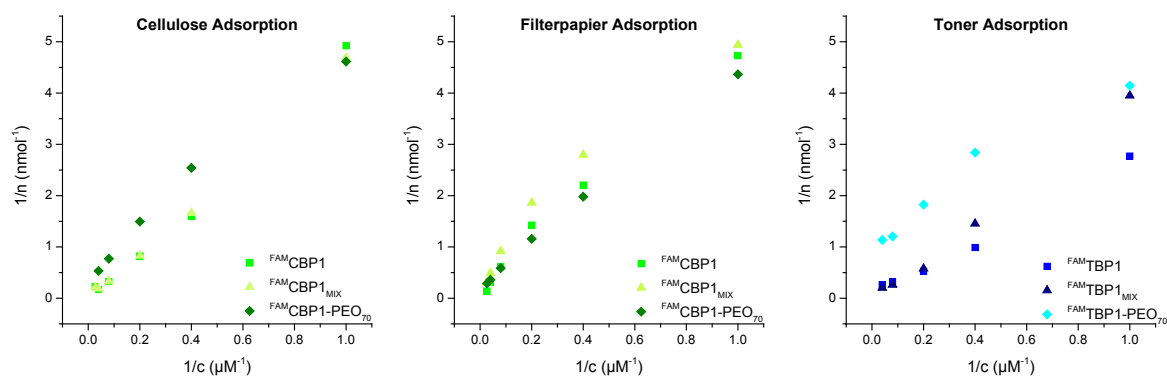
Um die Affinität von Peptiden und Konjugaten zur Substratoberfläche ansatzweise zu quantifizieren, wurden Messungen von Langmuir-Isothermen durchgeführt. Eine Langmuir-Isotherme ist ein Modell, das die Adsorption an der Substratoberfläche beschreibt. Es werden dafür folgende Annahmen vorausgesetzt: es wird lediglich eine Monolage ausgebildet, wobei alle Adsorptionsplätze gleichwertig sind und keine Wechselwirkungen zwischen bereits adsorbierten Peptiden und noch freien Adsorptionsplätzen auftreten. Mittels der Langmuir-Isothermen können Langmuir-Konstanten  $K_L$  erhalten werden, welche proportional zum Quotienten aus den Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption  $k_{Ads}$  und Desorption  $k_{Des}$  der Peptide auf der Substratoberfläche sind:

$$K_L = \frac{k_{Ads}}{k_{Des}} \quad (\text{Gl. 1})$$

Die Langmuir-Isotherme gibt mit der Konzentration  $c$  durch folgende Gleichung den Bedeckungsgrad  $\theta$  an:

$$\theta = \frac{K_L \cdot c}{1 + K_L \cdot c} \quad (\text{Gl. 2})$$

Für diese Messungen wurden systematische Verdünnungen der Peptide und Konjugate hergestellt und diese mit den einzelnen Substraten inkubiert. Die nach der Inkubation adsorbierte Menge wurde fluoreszenzspektroskopisch aus den Überständen der Lösungen ermittelt. Durch die lineare, reziproke Auftragung der Langmuir-Isothermen in Abhängigkeit von der Konzentration  $c$  können lineare Funktionen aus den Messwerten ermittelt werden, die es ermöglichen die Langmuir-Konstante und eine theoretische Stoffmenge für eine Monolage Peptid oder Konjugat  $n_{mono}$  auf der Substratoberfläche zu berechnen (vgl. Kapitel 6.5).



**Abbildung 4.33.** Reziproke Darstellung der Langmuir-Isothermen an einzelnen Substraten nach 10 min Inkubation von 3 mg Cellulose, 4 mg Filterpapier oder 25 mg Toner mit Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  bis 25  $\mu\text{M}$ ; Messungen an Cellulose und Filterpapier in TBST Puffer (0,5 mmol, pH 7,5), an Toner in Citratpuffer (50 mM, pH 6,5).

**Tabelle 4.12.** Aus den Langmuir-Isothermen ermittelte Werte: der Bestimmtheitsgrad  $R^2$  zeigt die Güte der gefitteten linearen Funktionen an,  $K_L$  ist die Langmuir-Konstante,  $n_{\text{mono}}$  ist die theoretisch berechnete Stoffmenge einer Monolage Peptid bzw. Konjugat auf der jeweiligen Substratoberfläche,  $n_{\text{real}}$  ist die tatsächlich gemessene Stoffmenge der Peptid bzw. Konjugat auf der jeweiligen Substratoberfläche.

Substrat	Peptid	$R^2$	$K_L$ (L/mol)	$n_{\text{mono}}$ (nmol/m <sup>2</sup> )	$n_{\text{real}}$ (nmol/m <sup>2</sup> )
Cellulose	<sup>FAM</sup> CBP1	0,995	1,4E+04	5,8	33
	<sup>FAM</sup> CBP1 <sub>MIX</sub>	0,996	1,2E+04	6,6	12
	<sup>FAM</sup> CBP1-PEO <sub>70</sub>	0,999	5,9E+04	1,0	9
Filterpapier	<sup>FAM</sup> CBP1	0,990	5,2E+04	1,2	15
	<sup>FAM</sup> CBP1 <sub>MIX</sub>	0,999	6,1E+04	1,2	15
	<sup>FAM</sup> CBP1-PEO <sub>70</sub>	0,965	1,2E+05	0,5	-
Toner	<sup>FAM</sup> TBP1	0,992	2,3E+04	5,4	40
	<sup>FAM</sup> TBP1 <sub>MIX</sub>	0,991	3,8E+04	3,7	42
	<sup>FAM</sup> TBP1-PEO <sub>70</sub>	0,958	3,6E+05	0,5	23

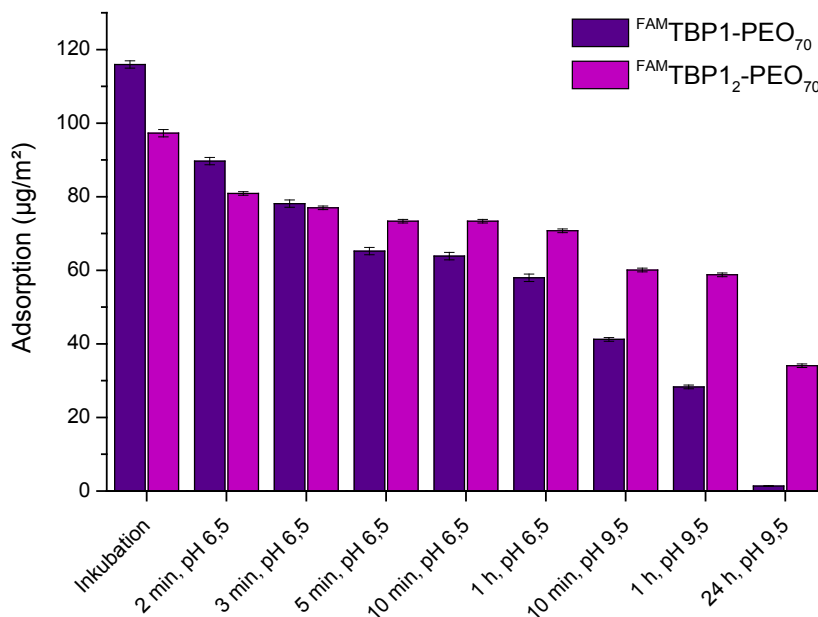
Aus Tabelle 4.12 geht hervor, dass alle ermittelten Langmuir-Konstanten im üblichen Bereich von  $10^4$  bis  $10^6$  L/mol für die Oberflächenadsorption von kurzen Peptiden liegen. So wurden bspw. für Gold-bindende Peptid Werte von  $2,3 \cdot 10^6$  –  $13,5 \cdot 10^6$  L/mol oder für Platin-bindende Peptide Werte zwischen  $3,4 \cdot 10^4$  –  $3,4 \cdot 10^6$  L/mol gefunden.<sup>[264-266]</sup> Die Werte der PEO-Konjugate sind entsprechend etwas größer als die der Peptide. Beim Vergleich der theoretisch berechneten Stoffmengen einer Monolage mit den tatsächlich gemessenen spezifischen Stoffmengen der

adsorbierten Peptide und Konjugate fallen allerdings schnell die Grenzen dieses Modells ins Auge. Die tatsächlich adsorbierten Stoffmengen sind deutlich höher als die berechneten. Dies ist vor allem bei den Peptiden auch zu erwarten, da es sich bei der Langmuir-Isotherme um ein Modell handelt, welches von der Bildung einer Monoschicht ausgeht. Unter realen Bedingungen bilden die Peptide jedoch Multischichten auf der Substratoberfläche aus. Dennoch können diese Berechnungen zusätzlich verdeutlichen, dass die mittels Phagen-Display selektierten Peptide gute Adsorptionseigenschaften zu ihren jeweiligen Substraten aufweisen.

#### 4.5.6 Verstärkung der Adsorption

Als eine Möglichkeit zur Verstärkung der Adsorption der Peptide auf der Substratoberfläche sei hier die Vervielfältigung der Peptidsequenz am Beispiel von TBP1-PEO<sub>70</sub> vorgestellt. Für diese Untersuchungen wurde analog zu <sup>FAM</sup>TBP1-PEO<sub>70</sub> ein <sup>FAM</sup>TBP1<sub>2</sub>-PEO<sub>70</sub> Konjugat hergestellt, das zwei verzweigte Toner-bindende Peptide enthält. Dafür wurde an das schon vorher verwendete TentaGel PAP® Harz als erste Aminosäure Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekuppelt. Auf diese Weise konnte dieselbe Sequenz parallel zweimal am PEO aufgebaut werden. Zur räumlichen Trennung beider 12-mere wurde nach der Fmoc-Abspaltung des ersten Lysins jeweils ein Gly<sub>3</sub>-Abstandshalter eingebaut. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der einfachen Aneinanderreihung einer Sequenz liegt darin, dass eine flexiblere multivalente Wechselwirkung mit der Substratoberfläche möglich ist. Im Vergleich der Inkubation von Toner mit dem einfachen und dem zweifachen Konjugat von TBP1 zeigt Abbildung 4.34 durch kumulative Auftragung der Adsorption nach unterschiedlich starken, aufeinander folgenden Waschschritten deutlich die erhöhte Stabilität an der Substratoberfläche. Dazu wurde der Elutionsdruck anfangs durch Erhöhung der Waschzeiten mit Citratpuffer (50 mM, pH 6,5) erhöht. Nachdem sich die Adsorptionswerte dadurch nicht mehr stark veränderten, wurde in weiteren Waschschritten ein basischer Glycinpuffer (50 mM, pH 9,5) zur weiteren Steigerung des Elutionsdrucks eingesetzt. Der inkubierte Toner wurde damit bis zu 24 h gewaschen. Anfangs war im Citratpuffer eine um ca. 15 µg/m<sup>2</sup> größere Adsorption von <sup>FAM</sup>TBP1-PEO<sub>70</sub> im Vergleich zu <sup>FAM</sup>TBP1<sub>2</sub>-PEO<sub>70</sub> zu beobachten. Dies lässt sich vermutlich auf Größenunterschiede der Konjugate und einen entsprechend höheren sterischen Anspruch von <sup>FAM</sup>TBP1<sub>2</sub>-PEO<sub>70</sub> auf der Oberfläche zurückführen. Aber bereits nach den ersten drei Waschschritten, die addiert 10 min im Citratpuffer ergeben, war die höhere Stabilität von <sup>FAM</sup>TBP1<sub>2</sub>-PEO<sub>70</sub> erkennbar. Diese wurde durch den erhöhten Elutionsdruck bei einem pH-Wert von 9,5 bereits nach zusätzlichen 10 min weiter verdeutlicht. Nach 24 h in Glycinpuffer wurde <sup>FAM</sup>TBP1-PEO<sub>70</sub> fast gänzlich von der

Toneroberfläche abgewaschen, während  $\text{FAM-TBP1}_2\text{-PEO}_{70}$  mit ca. 35 % weiter an der Oberfläche adsorbierte und eine deutlich stabilere Beschichtung bildete.



**Abbildung 4.34.** Vergleich der kumulativ aufgetragenen Adsorptionswerte von  $\text{FAM-TBP1-PEO}_{70}$  und  $\text{FAM-TBP1}_2\text{-PEO}_{70}$  an Toner: Adsorption in  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  nach 10 min Inkubation von 100 mg Toner mit je 1 mL einer 1  $\mu\text{M}$  Stammlösung in Citratpuffer und zunehmend längeren aufeinander folgenden Waschschritten in Citratpuffer (50 mM, pH6,5) und Glycinpuffer (50 mM, pH9,5).

Diese Ergebnisse verdeutlichen sehr anschaulich den positiven Multivalenz-Effekt wie er auch bei einzelnen Phagen mit je fünf Kopien derselben Sequenz auftritt. Die erhöhte Stabilität der multivalenten Adsorption kann die Stabilität der Beschichtung bei Bedarf deutlich erhöhen, sollte dies für bestimmte Anwendungen notwendig sein.

#### 4.6 Funktionalisierung beschichteter, gedruckter Muster

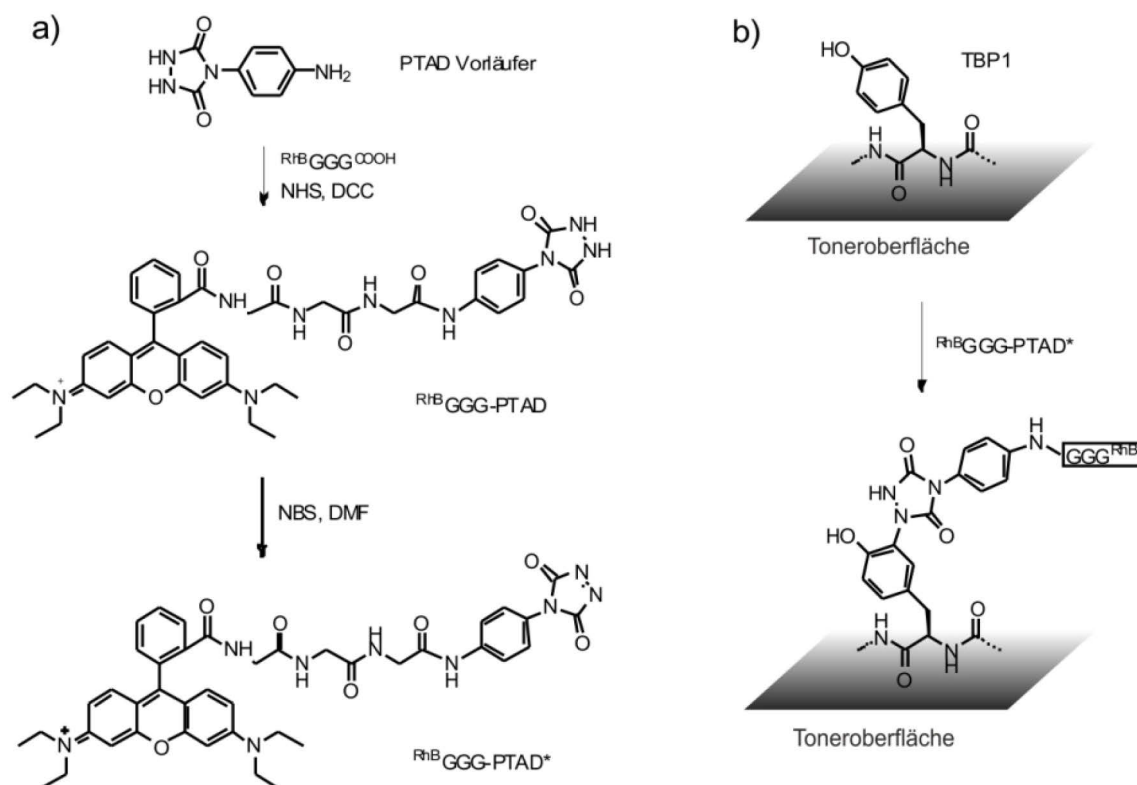
Nachdem nun die Wechselwirkungen zwischen den Peptiden bzw. Konjugaten und ihren jeweiligen Substraten ausführlich untersucht und charakterisiert wurden, sollen im Folgenden weiter Untersuchungen an bedrucktem Papier vorgestellt werden.

Als Model für eine nachträgliche Funktionalisierung der peptidbeschichteten gedruckten Muster soll im Folgenden die Kupplung des Fluorophors Rhodamin B sowie eines funktionalen Segments als Modell für ein Carbonat-bindendes Motiv ((DDRK)<sub>2</sub>) an TBP1 gezeigt werden. Letzteres wurde in Zusammenarbeit mit DR. P. WILKE durchgeführt.<sup>[267]</sup> Es wurde eine vielfältig anwendbare Funktionalisierungsstrategie der Tonerbeschichtung entwickelt, welche die literaturbekannte Ligation von Tyrosin-Seitenketten nutzte.<sup>[268]</sup>

TBP1 wurde dafür wie vorher beschrieben mittels PICUP auf der Toneroberfläche fixiert und anschließend durch chemoselektive Verknüpfung der Tyrosinreste mit 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) funktionalisiert (vgl. Abbildung 4.35 b)). Diese Chemie ist literaturbekannt und bietet den Vorteil, dass sie selektiv mit Tyrosinen reagiert.<sup>[268, 269]</sup> Während TBP1 zwei Tyrosine enthält (Tyr<sup>4</sup> und Tyr<sup>8</sup>), ist CBP1 frei von Tyrosinen. Daher konnten auf diese Weise funktionale Einheiten selektiv und kovalent auf der Tonerbeschichtung auf einem gedruckten Muster angebracht werden. Dabei ist es sehr wichtig, dass die Stabilisierung der Tonerbeschichtung mittels PICUP Strategie in wenigen Sekunden durchgeführt wird. Denn auch bei diesem Vorgang können unter anderem die Tyrosinreste von TBP1 umgesetzt werden und zur Vernetzung der einzelnen Peptide beitragen. Diese bereits umgesetzten Tyrosinreste werden nicht mehr mit PTAD funktionalisiert. Bei sehr kurzen Belichtungszeiten von unter drei Sekunden während der PICUP Stabilisierung konnte die nachträgliche PTAD-Funktionalisierung allerdings problemlos durchgeführt werden.

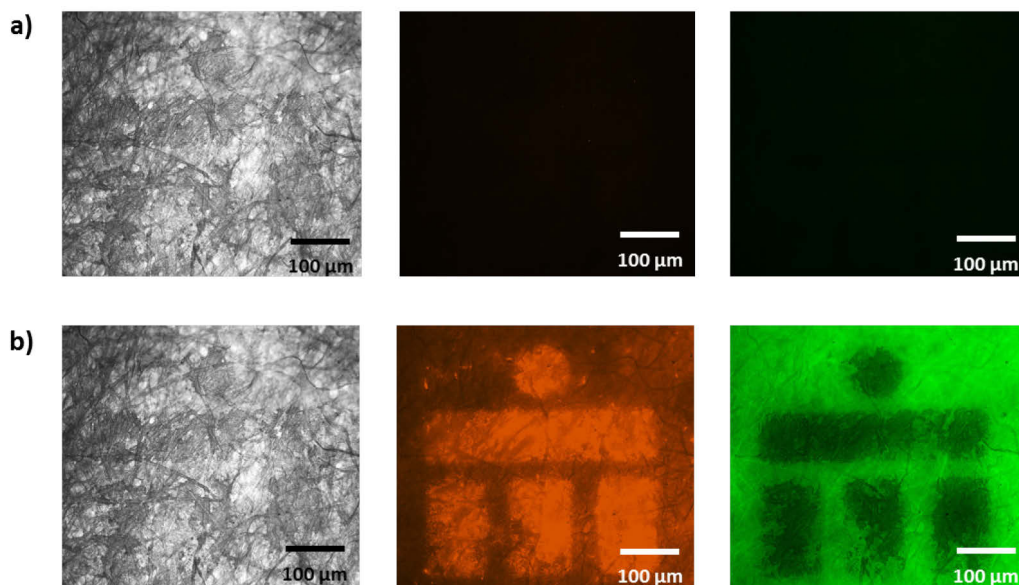
Zur Realisierung der Postfunktionalisierung der Tonerbeschichtung mit dem Fluorophor Rhodamin B wurde 4-Aminophenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion als PTAD Vorläufer eingesetzt. Mittels SPPS wurde an einem Chlortrityl-Harz ein kurzer GGG<sup>COOH</sup> Abstandhalter hergestellt und nach *N*-terminaler Funktionalisierung mit Rhodamin B entstand <sup>RhB</sup>GGG<sup>COOH</sup>. Daraus wurde durch Umsetzung mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und Dicyclohexycarbodiimid (DCC) ein NHS-Ester hergestellt. Dieser wurde mit 4-Aminophenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion umgesetzt, um <sup>RhB</sup>GGG-PTAD zu erhalten. Durch Aktivierung mittels *N*-Bromsuccinimid (NBS) in DMF konnte anschließend das aktive <sup>RhB</sup>GGG-PTAD\* hergestellt werden (vgl. Abbildung 4.35 a)).





**Abbildung 4.35.** Darstellung a) der Synthese von  $\text{RhB-GGG-PTAD}^*$  und b) der Funktionalisierung von TBP1 auf der Toneroberfläche mit  $\text{RhB-GGG-PTAD}^*$ .

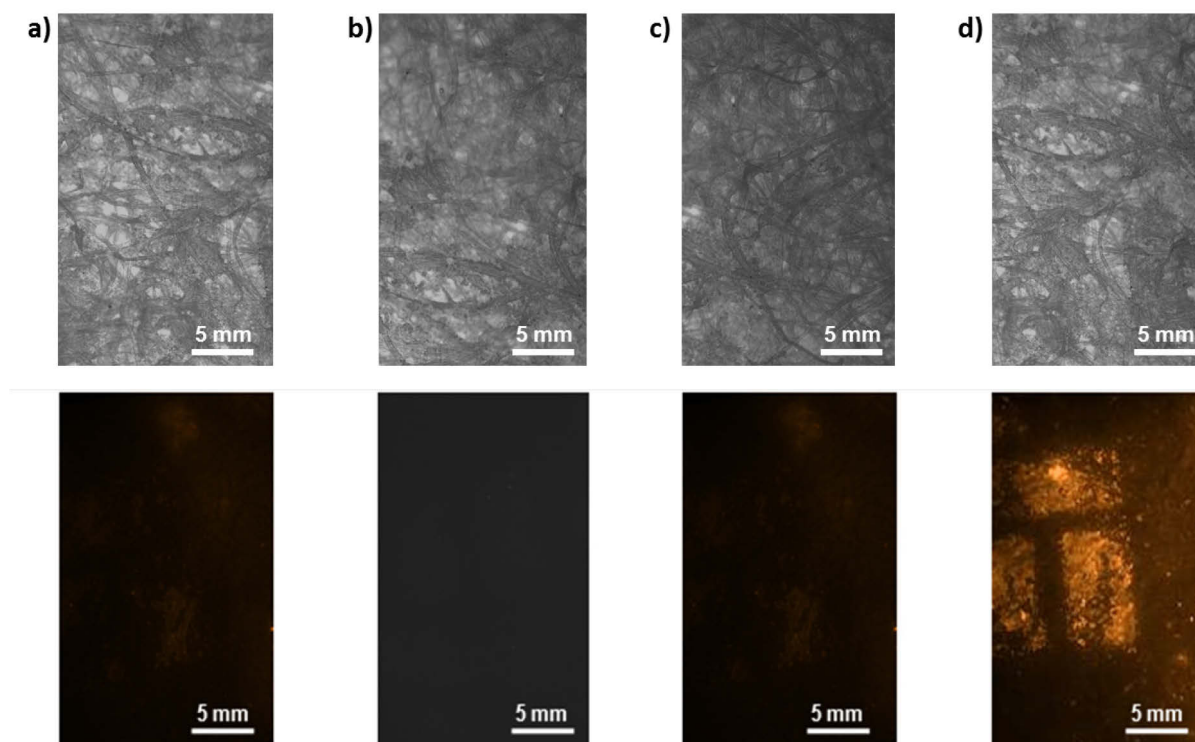
Um die nachträgliche Funktionalisierung eines gedruckten Musters durchzuführen, wurde dieses wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben zunächst in Citratpuffer mit TBP1 funktionalisiert. Anschließend wurde die Tonerbeschichtung mittels der Quervernetzung via PICUP stabilisiert. Zu dem beschichteten Muster in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (v/v 20/80) wurde schließlich das aktive  $\text{RhB-GGG-PTAD}^*$  direkt aus der Reaktionslösung hinzu gegeben. Nach 3 min wurde das gedruckte Muster dreimal gewaschen. Anschließend wurde die Funktionalisierung der Cellulose mit  $\text{FAM-CBP1}$  in TBST Puffer durchgeführt. Es konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie sowohl die nachträgliche Funktionalisierung von TBP1 mit  $\text{RhB-GGG-PTAD}^*$  auf der Toneroberfläche als auch die Beschichtung der Cellulose mit  $\text{FAM-CBP1}$  nachgewiesen werden. Abbildung 4.36 a) zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des mit TBP1 beschichteten, gedruckten Musters, welche wie zu erwarten weder im RhB- noch im FAM-Kanal Fluoreszenz aufwiesen. In Abbildung 4.36 b) sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach der Postfunktionalisierung mit  $\text{RhB-GGG-PTAD}^*$  sowie der Beschichtung der Cellulose mit  $\text{FAM-CBP1}$  zu sehen. Diese belegen die selektive Funktionalisierung der Tonerbeschichtung mit RhB (orange) sowie des Papiers mit  $\text{FAM-CBP1}$  (grün).



**Abbildung 4.36.** Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von gelb bedrucktem Filterpapier inkubiert mit TBP1 und quervernetzt via PICUP a) vor und b) nach der Funktionalisierung mit  $^{RhB}GGG-PTAD^*$  und  $^{FAM}CBP1$ ; Durchlichtaufnahme (links) und Fluoreszenzaufnahmen im RhB-Kanal (mittig) und im FAM-Kanal (rechts).

Um die Vielseitigkeit dieser Funktionalisierungsstrategie zu veranschaulichen, wurde auf diese Weise ein weiteres funktionales Segment auf der Toneroberfläche angebracht. Das Carbonat-bindende Motiv DDRK stammt aus dem Aragonit-bindenden Protein Pif80, das in einer Perlernauster gefunden wurde.<sup>[270]</sup> Durch die Funktionalisierung gedruckter Muster mit diesem Segment, könnten Studien zum Calciumwachstum daran durchgeführt werden. Als zweites Modell wurde daher das Peptid  $^{RhB}GG(DDRK)_2GGG-PTAD^*$  auf der Tonerbeschichtung angebracht. Das Vorgehen war dabei analog zur Funktionalisierung mit  $^{RhB}GGG-PTAD^*$ .

Abbildung 4.37 zeigt fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zu den durchgeführten Funktionalisierungsschritten. Nach der Inkubation eines gedruckten Musters mit TBP1 und der PICUP Stabilisierung war wie zu erwarten keine Fluoreszenz erkennbar (a). Nach dem finalen Schritt der Funktionalisierung der Tonerbeschichtung in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (v/v 20/80) mit  $^{RhB}GG(DDRK)_2GGG-PTAD^*$  konnte dagegen ein deutliches Fluoreszenzsignal beobachtet werden (d). Die erfolgreiche, nachträgliche Lokalisierung des funktionalen Modelpeptids auf dem Toner konnte dadurch belegt werden. Zwei zusätzliche Kontrollexperimente konnten die Selektivität dieser Funktionalisierungsstrategie verdeutlichen. Denn nach der Inkubation mit nicht aktiviertem  $^{RhB}GG(DDRK)_2GGG-PTAD$  auf der unbehandelten Toneroberfläche (b) und der mit TBP1 beschichteten Toneroberfläche (c) waren keine Fluoreszenzsignale erkennbar. Das bedeutet, das nicht aktivierte Modelpeptid wechselwirkt weder mit dem Toner noch mit der Tonerbeschichtung.



**Abbildung 4.37.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen im RhB-Kanal von gelb bedrucktem Filterpapier: a) nach der Inkubation und Quervernetzung von TBP1, b) nach der Inkubation mit nicht aktiviertem  $\text{RhB-GG(DDRK)}_2\text{GGG-PTAD}$  auf unbehandelter Toneroberfläche, c) nach der Inkubation mit nicht aktiviertem  $\text{RhB-GG(DDRK)}_2\text{GGG-PTAD}$  auf mit TBP1 beschichteter Toneroberfläche und d) nach der Inkubation und Quervernetzung von TBP1 und Postfunktionalisierung mit  $\text{RhB-GG(DDRK)}_2\text{GGG-PTAD}^*$ ; es sind jeweils Durchlichtaufnahmen (oben) und Fluoreszenzaufnahmen im RhB-Kanal (unten) gegenüber gesetzt; [Bedingungen: Inkubation beschichteter bzw. nicht-beschichteter Muster in Acetonitril-Wasser-Gemisch (v/v 20/80) mit aktiviertem bzw. nicht aktiviertem PTAD-Peptid gelöst in DMF für 5 min, anschließend dreimaliges Waschen in Citratpuffer für je 2 min].<sup>[270]</sup>

Somit konnte in diesem Kapitel eine effektive Strategie zur nachträglichen Funktionalisierung der peptidbeschichteten gedruckten Muster vorgestellt werden. Als funktionale Beispiele konnten ein Fluorophor sowie eine Carbonat-bindende Peptidsequenz an die Tonerbeschichtung gebunden werden. Dadurch wurde eine vielseitige Strategie zur schnellen, kostengünstigen und einfachen Funktionalisierung gedruckter Muster vorgestellt, die auf der selektiven Beschichtung mit spezifisch an Cellulose oder Toner-bindenden Peptiden beruht. Dies stellt einen neuen und leicht zugänglichen Weg zur Funktionalisierung gedruckter Muster auf Papier dar, der ein breites Spektrum zur Herstellung funktionaler Materialien ermöglichen könnte.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neue, kostengünstige und effiziente Strategie zur selektiven Beschichtung gedruckter Muster auf Papier entwickelt. Dies gelang über die materialspezifische Peptidadsorption zu Cellulose und Toner. Mit Hilfe des Phagen-Displays konnten die 12-mer Peptidsequenzen eines Cellulose-bindenden Peptids CBP1 (MHPNAGHGSLMR) und eines Toner-bindenden Peptids TBP1 (SGVYKVAYDWQH) selektiert und durch fluoreszenzbasierte Untersuchungen als spezifische Binder zum jeweiligen Substrat identifiziert werden. Es wurden umfangreiche Untersuchungen zu den Adsorptionseigenschaften dieser Peptide an den einzelnen Substraten durchgeführt. Anfängliche Probleme bezüglich der Spezifität der Peptidbeschichtungen konnten durch Optimierung der Inkubationsbedingungen bewältigt werden. Durch die Anbindung von Poly(ethylenoxid) (PEO) mit unterschiedlichen Polymerisationsgraden (DP=70 bzw. DP=120) an die Peptide konnte bei der Adsorption die Ausbildung von Multischichten auf den Substratoberflächen erfolgreich unterdrückt werden. Zusätzlich wiesen auch die PEO-Konjugate der Peptide noch eine gute Spezifität zu den gewünschten Substraten auf. Die Substratspezifität wurde weiterhin durch Vergleiche mit Modellpeptiden und Untersuchungen mit durchmischten Varianten von CBP1 und TBP1 belegt. Mithilfe von Alaninscans konnten vor allem entscheidende Bindungsmotive für CBP1 identifiziert werden, während die Adsorption von TBP1 zum Toner anscheinend hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen gesteuert wird. Zusätzliche Kinetik- und Bindungsstudien verdeutlichten mithilfe der Langmuir-Isothermen die guten Adsorptionseigenschaften der selektierten Peptide. Außerdem konnte die Vervielfältigung der Peptidsequenz am Beispiel von TBP1<sub>2</sub>-PEO<sub>70</sub> als Möglichkeit zur Verstärkung der Adsorption der Peptide auf der Substratoberfläche aufgezeigt werden.

Die spezifische Beschichtung gedruckter Muster mit CBP1 und TBP1 gelang nach anfänglichen Schwierigkeiten, indem die Tonerbeschichtung über die Strategie der photo-induzierten Quervernetzung unmodifizierter Proteine (PICUP, *photo-induced cross-linking of unmodified proteins*) stabilisiert wurde. Als eine Methode zur nachträglichen Funktionalisierung der beschichteten Muster wurde die chemoselektive Ligation von Tyrosin mit 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) vorgestellt. Da CBPP1 eine Tyrosin-frei Sequenz ist, konnte auf diesem Wege TBP1 auf der Toneroberfläche selektiv funktionalisiert werden. Dadurch konnten die funktionalen Segmente <sup>RhB</sup>GGG-PTAD\* und <sup>RhB</sup>GG(DDRK)<sub>2</sub>GGG-PTAD\* nachträglich kovalent und selektiv auf der Tonerbeschichtung angebracht werden.

Durch den Einsatz von handelsüblichem Papier und Toner und eines kommerziellen Laserdruckers bietet die hier vorgestellte Methodik einen neuartigen und leicht zugänglichen Weg zur Funktionalisierung gedruckter Muster. Die selektive Beschichtung ist insgesamt in wenigen Minuten möglich und eröffnet somit ein breites Anwendungsspektrum zur Herstellung funktionaler Materialien. Diese Arbeit kann damit einen Grundstein für neue Wege zur Entwicklung kostengünstiger, funktionaler Materialien für die Sensorik bzw. Diagnostik auf Papierbasis legen.

## 6 EXPERIMENTELLER TEIL

### 6.1 Materialien

Kommerzieller Toner (TN-3200, TN-242Y, TN-242C, TN-242M) wurde von Brother International GmbH (Bad Vilbel, Deutschland) erworben und Cellulose Pulver (mikrokristallin) von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland). Für Adsorptionsuntersuchungen verwendetes Filterpapier vom Typ MN 640 d (langsam filtrierend,  $\alpha$ -Cellulose > 95 %, Aschegehalt < 0,01 %, Flächengewicht 85 g/m) wurde von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

#### 6.1.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden, wenn nicht anders erläutert, ohne weitere Aufreinigung verwendet:

**Tabelle 6.1.** Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien: <sup>1</sup>über Calciumhydrid getrocknet und destilliert; <sup>2</sup>vor Gebrauch destilliert; <sup>3</sup>vor Gebrauch filtriert; <sup>4</sup>über Kaliumhydroxid getrocknet und anschließend destilliert.

Chemikalie	Lieferant
Agarose	Serva (Heidelberg, Deutschland)
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland)
DCC (Dicyclohexylcarbodiimid)	
DCM (peptide grade <sup>1</sup> )	IRIS Biotech (Markredwitz, Deutschland)
DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure, 99 %)	Acros Organics (Geel, Belgien)
DIPEA ( <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin, peptide grade <sup>2</sup> )	Acros Organics
DMF ( <i>N,N</i> -Dimethylformamid)	Biosolve (Dieuze, Frankreich)
EDT (1,2-Ethandithiol)	Acros Organics
FAM (5(6)-Carboxyfluorescein, bioreagent grade)	Sigma-Aldrich
Fmoc-L-Aminosäuren(SchG)-OH	Novabiochem (Darmstadt, Deutschland); IRIS Biotech
Glycin (> 99%)	Sigma-Aldrich
Guanidinium Hydrochlorid (99,5 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat)	IRIS Biotech
Hefeextrakt	Fisher BioReagents (Schwerte, Deutschland)
HOBt (1-Hydroxybenzotriazol)	IRIS Biotech
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid > 99 %)	Carl Roth

## EXPERIMENTELLER TEIL

LB-Medium (Lennox)	Carl Roth
MeOH (Methanol)	Sigma-Aldrich
NaN <sub>3</sub> Natriumazid	Sigma-Aldrich
NaCl Natriumchlorid	J. T. Baker (Deventer, Niederlande)
NBS ( <i>N</i> -Bromsuccinimid, 99 %)	ABCR (Karlsruhe, Deutschland)
NHS ( <i>N</i> -Hydroxysuccinimid)	
NMM ( <i>N</i> -Methylmorpholin, 99.9 %)	Acros Organics
NMP ( <i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon, peptide grade <sup>3</sup> , > 99,9 %)	IRIS Biotech
PEG8000 (Poly(ethylenglykol) MW 8000)	Acros Organics
Piperidin (peptide grade <sup>4</sup> , 99 %)	Sigma-Aldrich
Polystyrol Fmoc-Rinkamid Harz	IRIS Biotech
PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat)	IRIS Biotech
RhB (Rhodamin B, bioreagent grade)	Sigma-Aldrich
Ru-bpy (Tris(bipyridin)-Ruthenium(II)chlorid)	Sigma-Aldrich
TentaGel PAP Harze	RAPP Polymere (Tübingen, Deutschland)
TentaGel S RAM Harz	RAPP Polymere
TES (Triethylsilan, > 98 %)	Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland)
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
TFA (Trifluoressigsäure, peptide grade <sup>2</sup> )	Sigma-Aldrich
TFA-d1 (deuterierte Trifluoressigsäure, 99,5 %)	Acros Organics
Thioanisol	Sigma-Aldrich
THF (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich
TMSBr (Trimethylsilylbromid, 98 %)	IRIS Biotech
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Fisher BioReagents
Trypsin-Lösung (0,25 % w/v in BPS w/Ca <sup>2+</sup> )	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Trypton	Fluka (Seelze, Deutschland)
Tween20	Fisher BioReagents
Xgal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid, > 99 %)	Sigma-Aldrich
Zitronensäure	Sigma-Aldrich
α-CHCA (α-Cyano-4-hydroxymethylsäure, 99 %)	Sigma-Aldrich

### 6.1.2 Phagen-Display

Die M13 Phagen-Display Bibliothek und der zur Amplifikation benötigte *E.coli* Wirtsstamm ER2738 ( $F' proA^+B^+lacI^q \Delta(lacZ)M15$  zzf: *Tn10(Tet<sup>R</sup>)/fhuA2 glnV $\Delta$ (lac-proAB) thi-1  $\Delta$ (hds-mcrB)-5*) wurden bei New England Biolabs Inc. (Frankfurt a. M., Deutschland) im PH.D-12 PEPTIDE LIBRARY KIT E8110S erworben. Tabelle 6.2 zeigt die prozentualen Häufigkeiten einzelner Aminosäuren innerhalb der verwendeten Phagen Bibliothek laut Hersteller.

**Tabelle 6.2.** Berechnete und beobachtete Häufigkeiten der einzelnen Aminosäuren in den insertierten 12-mer Sequenzen der verwendeten Phagen Bibliothek laut Hersteller.<sup>[146]</sup>

Aminosäure	Codon	berechnete Häufigkeit [%]	beobachtete Häufigkeit [%]
Arg	CGK, AGG	9,4	5,7
Leu	CTK, TTG	9,4	8,9
Ser	TCK, AGT	9,4	11,2
Ala	GCK	6,2	7,4
Gly	GGK	6,2	5,8
Pro	CCK	6,2	8,1
Thr	ACK	6,2	7,8
Gln	CAG, TAG	6,2	3,9
Val	GTK	6,2	6,1
Asn	AAT	3,1	4,5
Asp	GAT	3,1	4,6
Cys	TGT	3,1	1,5
Glu	GEG	3,1	3,1
His	CAT	3,1	4,6
Ile	ATT	3,1	3,4
Lys	AAG	3,1	2,3
Met	ATG	3,1	3,1
Phe	TTT	3,1	2,7
Trp	TGG	3,1	2,3
Tyr	TAT	3,1	3,3

Der DNA-Primer -96gIII (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3') zur Analyse der insertierten Sequenzen wurde in HPLC-Qualität von Biomers.net (Ulm, Deutschland) bezogen. Das zur



Extraktion der Phagen-DNA verwendete QIAPREP SPIN M13 KIT (50) inklusive der benötigten Pufferlösungen wurde von der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) erworben.

## 6.2 Lösungen und Puffer

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g (85 mmol) NaCl wurden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst und nach Autoklavieren bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Top-Agar: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl (85 mmol) sowie 7 g Agarose wurden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst und nach Autoklavieren bei RT gelagert.

LB-Agar: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl (85 mmol) sowie 15 g Agarose wurden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst und nach Autoklavieren bei RT gelagert.

TBS Puffer: 6 g (50 mmol) Tris und 8,7 g (150 mmol) NaCl wurden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,5 eingestellt und nach Autoklavieren bei RT gelagert.

TBST Puffer: Phagen-Display: 6 g (50 mmol) Tris, 8,7 g (150 mmol) NaCl und 5 g (0,5 % (w/v)) Tween20 wurden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,5 eingestellt und nach Autoklavieren bei RT gelagert.

Verdünnung für Adsorptionsuntersuchungen: 60 mg (0,5 mmol) Tris, 87 mg (1,5 mmol) NaCl und 50 mg (5 % (w/v)) Tween20 wurden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,5 eingestellt und bei RT gelagert.

SB-Medium: 30 g Trypton, 15 g Hefeextrakt und 15 g (255 mmol) NaCl wurden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst und nach Autoklavieren bei RT gelagert.

TBS/NaN<sub>3</sub>: 6 g (50 mmol) Tris, 8,7 g (150 mmol) NaCl und 0,2 g (0,02 % (w/v)) NaN<sub>3</sub> wurden in 1 L bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,5 eingestellt und nach Autoklavieren bei RT gelagert.

Tris-HCl: 12,1 g (0,1 mmol) Tris wurden in 100 mL bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 9,1 eingestellt und nach Autoklavieren bei RT gelagert.

Glycin-HCl: 1,5 g (20 mmol) Glycin wurden in 100 mL bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 2,2 eingestellt und nach Autoklavieren bei RT gelagert.

PEG/NaCl: 20 g (25 mmol) PEG<sub>8000</sub> und 14,6 g (250 mmol) NaCl wurden in 100 mL bidestilliertem Wasser gelöst und nach Autoklavieren bei RT gelagert.

IPTG/XGal: 1,25 g (5 mmol) IPTG und 1 g (2,5 mmol) XGal wurden in 25 mL DMF gelöst und bei -20 °C gelagert.

Tetracyclin: 1 g (2,25 mmol) Tetracyclin wurde in 50 mL Ethanol (vergällt) gelöst und bei -20 °C gelagert.

Citratpuffer: 4,8 g (25 mmol) Zitronensäure wurden in 500 mL bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 6,5 eingestellt und bei RT gelagert.

Phosphatpuffer: 0,6 g (5 mmol) Natriumhydrogenphosphat wurden in 100 mL bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 8 eingestellt und bei RT gelagert.

Glycinpuffer: 409 mg (7 mmol) NaCl und 375 mg (5 mmol) Glycin wurden in 100 mL bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 9,5 bzw. 10 eingestellt und bei RT gelagert.

### 6.3 Messgeräte

#### **Rasterelektronenmikroskop (REM) und energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)**

Die Rasterelektronenmikroskopie und die energiedispersive Röntgenspektroskopie wurden an einem TABLETOP MICROSCOPE TM-100 der Firma Hitachi (Tokyo, Japan) mit einer vorzentrierten Glühdrahtkathode zur Elektronenstrahlerzeugung und einem hochempfindlichen BSE (engl. *back scattered electrons*) Halbleiterdetektor bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV durchgeführt. Die Bilder wurden ohne vorheriges Sputtern der Probe aufgenommen.

#### **Raman-Mikroskopie**

Die konfokale Raman-Mikroskopie wurde an einem ALPHA300 der Firma Witec (Ulm, Deutschland) mit einem Laser der Wellenlänge 532 nm und Objektiven mit 10-, 20-, 50- oder 100-facher Vergrößerung der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) durchgeführt.

#### **(Fluoreszenz)mikroskopie**

Für mikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurde ein AXIO OBSERVER.A1 der Firma Carl Zeiss (Jena, Deutschland) mit den Zeiss-Filtersätzen 38HE (Anregung bei  $470 \pm 20$  nm, Emission bei  $52 \pm 25$  nm) für FAM-markierte Proben bzw. 43HE (Anregung bei  $550 \pm 13$  nm, Emission bei  $605 \pm 35$  nm) für RhB-markierte Proben aufgenommen. In der Arbeit miteinander verglichene Bilder wurden jeweils unter denselben Parametern (Laserintensität, Messdauer, etc.) mikroskopiert.

### **BET Messungen**

Die spezifische Oberfläche wurde durch N<sub>2</sub>-Adsorption nach BRUNAUER, EMMETT UND TELLER an einem ASAP2020 der Firma Micromeritics (Norcross, GA, USA) ermittelt. Die Proben wurden vor der Messung für 17 h bei 50 °C am Vakuum ausgeheizt. Die Auswertung erfolgte nach dem BET-Modell der geräteeigenen Software.

### **Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)**

<sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden an einem AV 500 Spektrometer der Firma Bruker (Billerica, MA, USA) mit einer Messfrequenz von 500,13 MHz bei RT aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde CDCl<sub>3</sub> bzw. TFA-d verwendet. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  wurden relativ zu Tetramethylsilan in parts per million (ppm) angegeben. Für die Signalmultiplizitäten gelten folgende Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qi = Quintett, m = Multipllett.

### **Ultraschallbad**

Zur Ultraschallbehandlung während des Phagen-Displays (Protokoll T2) wurde ein SONOREX RK 103 H Ultraschallbad der Firma Bandelin (Berlin, Deutschland) mit einer festen Betriebsfrequenz von 35 kHz eingesetzt.

### **Präparative HPLC**

Die Peptide wurden, wenn nötig, bei einer Flussrate von 22 mL/min an einem PROMINENCE LC 20-AP System der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) mit einem CBN-20A Kommunikationsmodul, einem SIL-20A HT Autosampler und einem FRC-10A Fraktionssammler präparativ aufgereinigt. UV/Vis-Detektion erfolgte durch einen SPD-10A Detektor und die Trennung der Produkte wurde durch Verwendung einer SYNERGIE 4 $\mu$  FUSION-RP 80A Säule der Firma Phenomenex (Torrance, CA, USA) erreicht. Für die mobile Phase wurde ein Gemisch aus A (99,9 % Wasser, 0,1 % Ameisensäure) und B (99,9 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure) verwendet.

### **Analytische HPLC-MS**

Zur Massenanalyse mittels analytischer HPLC wurde ein System der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) mit einer SLC-10A VP Steuereinheit, einer LC-10AD VP Flüssigchromatographie Pumpeneinheit und einer auf 40 °C temperierten EC 150/2 NUCLEODUR POLAR TEC Umkehrphasensäule der Firma Machery & Nagel (Düren, Deutschland) genutzt. Die Signale wurden mittels eines SPD-10A VP UV/Vis-Detektors bei einer Wellenlänge von 210 nm bzw. 260 nm detektiert. Für die mobile Phase wurde ein Gemisch aus A (99,9 % Wasser, 0,1 % Ameisensäure) und B (99,9 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure) mit einer Flussrate von

0,3 mL/min verwendet. Zur massenspektrometrischen Detektion diente ein QP8000 Elektrosprayionisations-Massenspektrometer für die Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (LC-ESI-MS) der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) im positiven Beschleunigungsmodus.

### **UPLC-ESI-MS**

UPLC Messungen wurden an einem ACQUITY-UPLC H-CLASS CM Kernsystem der Firma Waters (Milford, MA, USA) mit einem ACQUITY-UPLC PDA und QDa Detektor und einem LCT PREMIER XE Massenspektrometer für UPLC-HRMS durchgeführt. Es wurde eine ACQUITY-UPLC HSS T3 Säule von Waters bei 40 °C verwendet.

### **MALDI-TOF-MS**

Massenspektrometrische Untersuchungen zur Identifikation der Peptide und Konjugate wurden an einem AUTOFLEX III SMARTBEAM der Firma Bruker (Billerica, MA, USA) im linear positiven oder negativen Modus durchgeführt.

### **MALDI Bildgebung**

MALDI-TOF-MS Messungen zur Bildgebung wurden an einem MALDI LTQ ORBITRAP XL der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) durchgeführt und mithilfe der IMAGEQUEST 1.0.1 Software ausgewertet.

### **UV/Vis-Spektroskopie**

Zur Überprüfung der Reife einer *E.coli* Kultur wurde ein SMARTSPEC PLUS Spektrometer der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) verwendet. Für die Quantifizierung der ssDNA der zu sequenzierenden Phagen wurde ein NANODROP ND-1000 Spektrophotometer der Firma PeqlabBiotechnologie (Erlangen, Deutschland) verwendet.

### **Automatisierte Festphasenpeptidsynthese**

Die Festphasenpeptidsynthese wurde an einem ABI 433A Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems (Life Technologies Corporation, Darmstadt, Deutschland) nach Standard Fmoc-Strategie durchgeführt. Die Quantifizierung des abgespaltenen Fmoc wurde bei einer Wellenlänge von 301 nm an einem UV/Vis-Detektor von Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) automatisiert gemessen.

### **Gefriertrocknung (Lyophilisierung)**

Die Gefriertrocknungen wurden in einer Lyophille ALPHA 1-4 von Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen (Osterode, Deutschland) für zwei bis drei Tage durchgeführt. Vorher

wurden die Peptide bzw. Konjugate in 2-3 mL Millipore-Wasser gelöst und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **Infrarotspektroskopie (IR)**

Fouriertransformationsinfrarotspektroskopie (ATR-FT-IR) wurde an einem FT/IR-4200 Spektrometer der Firma Jasco (Gross-Umstadt, Deutschland) oder einem VERTEX 70v Spektrometer der Firma Bruker (Billerica, MA, USA) aufgenommen. Die auftretenden IR-Banden werden je nach Schwingungsart mit  $\nu$  (Streckschwingung),  $\delta$  (Beugungsschwingung),  $\gamma$  (Deformationsschwingung aus der Ebene heraus) und  $\tau$  (Torsionsschwingungen) und nach ihrer relativen Intensität mit vw (*very weak*, sehr schwach), w (*weak*, schwach), m (*medium*, mittel), s (*strong*, stark), vs (*very strong*, sehr stark) gekennzeichnet. Die charakteristischen Banden der Peptidbindungen werden mit Amid A, Amid B und Amid I – VII bezeichnet.

### **Fluoreszenzspektroskopie**

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde an einem SYNERGY MX MICROPLATE Spektrophotometer der Firma BioTek (Bad Friedrichshall, Deutschland) in schwarzen 96-well-Mikrotiterplatten aufgenommen.

### **Drucker**

Zum Drucken von schwarzen Mustern wurde ein HL-5350 DN Drucker der Firma Brother International GmbH (Nagoya, Japan) verwendet, während für farbigen Druck ein LASERJET PRO CM1415 FN COLOR MFP von HP (Palo Alto, CA, USA) genutzt wurde. Die Toner für beide Drucker enthalten laut Sicherheitsdatenblatt ein Poly(styrol-co-butylat) als Hauptbestandteil. Beim Drucken wurden jeweils die höchst möglichen Einstellungen für Auflösung und Druckqualität gewählt.

## **6.4 Phagen-Display**

Alle Folgenden Arbeiten wurden in einem Labor der biologischen Schutzstufe 1 auf desinfizierten Arbeitsflächen in steriler Umgebung durchgeführt.

### **Herstellung von *E.coli* Vorratsplatten**

LB-Agar wurde in der Mikrowelle geschmolzen und nach Abkühlen auf unter 70 °C wurden zu 25 mL dieser Lösung 25  $\mu$ L Tetracyclin-Lösung hinzugegeben, auf eine Petrischale gegossen und auf RT abgekühlt. Das ausgehärtete Gel wurde mit *E.coli* Bakterien (ER2738) geimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde bei 4 °C für maximal 4 Wochen gelagert.

### **Ansetzen einer *E.coli* Kultur**

In einen autoklavierten Erlenmeyerkolben wurden 10 mL LB-Medium, 10  $\mu$ L Tetracyclin-Lösung und eine Pipettenspitze, mit der vorsichtig Bakterien von einer *E.coli* Vorratsplatte gestrichen wurden, gegeben und über Nacht bei 37 °C und 200 U/min inkubiert. Die Reife einer *E.coli* Kultur wurde, wenn nötig, in einer Einmalküvette über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dazu wurde ein SMARTSPEC PLUS Spektrometer der Firma Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) verwendet. Die gewünschte mittlere exponentielle Phase des Bakterienwachstums (engl. *mid-log phase*) wurde bei einem  $OD_{600} \approx 0,5$  erreicht. Dann konnten die Bakterien mit den Phagen infiziert werden.

### **Herstellung von LB/IPTG/XGal-Platten**

1 L LB-Agar wurde in der Mikrowelle geschmolzen und nach Abkühlen auf unter 70 °C wurde 1 mL IPTG/XGal-Lösung hinzugegeben. Je 20 mL dieser Lösung wurden in Petrischalen gegossen und nach Abkühlen invers im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

### **Amplifikation (Vervielfältigung der eluierten Phagen)**

In einem autoklavierten Erlenmeyerkolben wurden 40 mL LB-Medium, 400  $\mu$ L einer am Vorabend angesetzten *E.coli* Kultur, 80 % der zu amplifizierenden Phagen-Lösung bzw. ein einzelner Plaque von einer Titerplatte und 40  $\mu$ L Tetracyclin-Lösung zusammen gegeben. Die Kultur wurde über 4,5 h bei 37 °C und 200 U/min inkubiert und anschließend wurden die *E.coli* Zellen mittels Zentrifugation in 50-mL-Zentrifugenröhrchen für 20 min bei 4 °C und 4300 U/min abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zugabe von 6,6 mL PEG/NaCl wurden die Phagen über Nacht bei 4 °C gefällt. Das Gemisch wurde für 45 min bei 4 °C und 4300 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Phagen wurden in 1 mL TBS Puffer gelöst. Nach Überführung in ein steriles Schnappdeckelreaktionsgefäß wurden eventuell übrig gebliebene *E.coli* Zellen durch zweimaliges Zentrifugieren über 5 min bei 10000 U/min quantitativ abgetrennt und der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Schließlich wurden die Phagen durch Zugabe von 150  $\mu$ L PEG/NaCl für 30 min auf Eis gefällt und durch Zentrifugation für 15 min bei 10000 U/min abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Phagen zur Lagerung in 100  $\mu$ L TBS/ $NaN_3$  resuspendiert. Diese Lösung konnte nun als neue Bibliothek für eine weitere Screening Runde bzw. zur Sequenzierung genutzt werden.

### **Titerbestimmung**

Die Titerbestimmung diente zur Quantifizierung eluierter bzw. amplifizierter Phagen. Zunächst wurde eine *E.coli* Kultur angesetzt, indem 7-8 mL LB-Medium mit *E.coli* (ER2738) geimpft und

bei 200 U/min und 37 °C für 3-5 h inkubiert wurden (bis  $OD_{600} \approx 0,5$ ). Anschließend wurden je 200 µL dieser Lösung mit je 10 µL der Verdünnungsreihen der entsprechenden Phagenlösungen in LB-Medium (eluierte Phagen:  $1:10^1 - 1:10^3$ , amplifizierte Phagen:  $1:10^6$ ,  $1:10^8 - 1:10^{10}$ ) infiziert und für 5 min bei RT inkubiert. Diese infizierten Kulturen wurden nacheinander in Zentrifugenröhrchen mit 5-7 mL 45 °C warmem Top-Agar überführt und gemischt. Schließlich wurden die Kulturen auf vorgewärmte LB/IPTG/XGal-Platten gegossen und vorsichtig gleichmäßig verteilt. Nach Abkühlen für ca. 5 min wurden die invertierten Platten über Nacht bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Kolonien wurden auf Platten ausgezählt, die ca. 100 Plaques aufwiesen. Die Phagenkonzentration konnte anschließend nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\frac{\text{Phagen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Plaquantzahl} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{pipettiertes Volumen [ml]}}$$

Ab einer Konzentration von mindestens  $10^9$  je 10 µL wurden die amplifizierten Phagen für die nächste Screening Runde eingesetzt. Betrug die ermittelte Konzentration weniger, wurde erneut amplifiziert und eine weitere Titerbestimmung durchgeführt.

### **Screening Protokolle**

Mikrokristalline Cellulose wurde im Screening Prozess ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt, während der Toner zuvor auf bis zu 200 °C aufgeheizt wurde, um den Fixierschritt während des Druckvorgangs zu simulieren. Dabei entsteht eine geschlossene Tonerfläche, die nach Abkühlen in kleinere Stücke im mm-Bereich zerbrochen wurde, um die verfügbare Oberfläche zu erhöhen.

### Protokoll C1 & T1

Jeweils 10 mg Substrat und Anti-Substrat wurden für 1 h mit 1 mL TBST Puffer gewaschen (25°C, 750 U/min), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die überstehenden Lösungen wurden nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min verworfen und das jeweilige Anti-Substrat wurde in 1 mL TBST Puffer mit 10 µL Phagenbibliothek für 30 min bei 25 °C und 750 U/min inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß mit dem entsprechenden Substrat überführt und erneut 30 min bei 25 °C und 750 U/min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min verworfen und das Substrat 10-mal für je 1 min mit 1 mL TBST Puffer gewaschen. Die schwach bindenden Phagen wurden durch Zugabe von 1 mL Glycin/HCl für 10 min bei 25 °C und 750 U/min eluiert und das Substrat 2-mal mit je 1 mL TBS Puffer gewaschen. Schließlich

wurden die stark bindenden Phagen durch Zugabe von 1 mL Trypsin für 30 min bei 25 °C und 750 U/min eluiert. Nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min wurde der Überstand in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und der proteolytische Verdau durch Zugabe von 2 mL SB-Medium gestoppt.

### Protokoll T2

Jeweils 10 mg Toner und Cellulose wurden für 1 h mit 1 mL TBST Puffer gewaschen (25°C, 750 U/min), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die überstehenden Lösungen wurden nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min verworfen und die Cellulose wurde in 1 mL TBST Puffer mit 10 µL Phagenbibliothek für 10 min bei 25 °C und 1000 U/min inkubiert. Dabei wurde das Reaktionsgefäß alle 2 min (insgesamt 4-mal) für ca. 2 s in ein Ultraschallbad (Bandelin (Berlin, Deutschland) SONOREX RK103H, 35 kHz) getaucht, um schwach bindende Phagen wieder abzulösen und so neue Bindungsstellen für potentiell stärker bindende Phagen zu generieren. Nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß mit dem bereits gewaschenen Toner überführt und erneut 10 min mit Ultraschalleinwirkung (alle 2 min für ca. 2 s) bei 25 °C und 1000 U/min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min verworfen und der Toner 10-mal für je 1 min mit 1 mL TBST Puffer gewaschen. Die schwach bindenden Phagen wurden durch Zugabe von 1 mL Glycin/HCl für 20 min bei 25 °C und 1000 U/min eluiert und das Substrat 2-mal mit je 1 mL TBS Puffer gewaschen. Schließlich wurden die stark bindenden Phagen durch Zugabe von 1 mL Trypsin für 30 min bei 25 °C und 1000 U/min eluiert. Nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min wurde der Überstand in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und der proteolytische Verdau durch Zugabe von 2 mL SB-Medium gestoppt.

### Protokoll T3

In der ersten und zweiten Screening Runde wurden 10 mg Toner für 1 h mit 1 mL TBST Puffer gewaschen (25°C, 750 U/min) und die überstehende Lösung wurde nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min verworfen. Der Toner wurde in 1 mL TBST Puffer mit 10 µL Phagenbibliothek für 15 min bei 25 °C und 1000 U/min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min verworfen und das Substrat 10-mal für je 1 min mit 1 mL TBST Puffer gewaschen. Die schwach bindenden Phagen wurden durch 10-maliges Waschen für 1 min mit je 1 mL Glycin/HCl bei 25 °C und 1000 U/min eluiert und der Toner wurde 2-mal mit je 1 mL TBS Puffer gewaschen. Schließlich wurden die stark bindenden Phagen durch Zugabe



von 1 mL Trypsin für 30 min bei 25 °C und 1000 U/min eluiert. Nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min wurde der Überstand in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und der proteolytische Verdau durch Zugabe von 2 mL SB-Medium gestoppt. In der dritten und vierten Screening Runde wurden zunächst 10 mg Cellulose ebenfalls für 1 h mit 1 mL TBST Puffer gewaschen (25°C, 750 U/min) und nachdem die überstehende Lösung verworfen wurde in 1 mL TBST Puffer mit 10 µL Phagenbibliothek aus der vorherigen Screening Runde für 15 min bei 25 °C und 1000 U/min inkubiert. Nach Zentrifugation für 15 s bei 13400 U/min wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß mit 10 mg Toner, die vorher ebenfalls für 1 h mit 1 mL TBST Puffer gewaschen (25°C, 750 U/min) wurden, überführt und erst dann wurde das Substrat analog zum Vorgehen in den ersten beiden Screening Runden inkubiert und gewaschen und die Phagen eluiert.

### **DNA Extraktion**

Zur DNA Extraktion wurde ein einzelner Plaque von der Titerbestimmung der im Screening Prozess selektierten Phagen mit einer Pipette aufgenommen und wie oben beschrieben amplifiziert. Von der erhaltenen Phagenlösung in TBS/NaN<sub>3</sub> wurden 80 % zur Extraktion verwendet. Die DNA wurde mit Hilfe eines QIAPREP SPIN M13 KIT nach den beigelegten Anweisungen durchgeführt. Für diese Quantifizierung der erhaltenen ssDNA wurde ein Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer der Firma PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, Deutschland) verwendet. Für die Messung wurden 3 µL der jeweiligen DNA-Lösung aufgetragen. Betrug die ermittelte DNA-Konzentration weniger als 40 ng/µL wurde die DNA-Lösung aufkonzentriert, bevor sie zur Sequenzierung abgeschickt wurde.

### **Aufkonzentrieren der DNA**

Zur Aufkonzentrierung der Phagen DNA wurden, wenn nötig, 4 µL einer 5 M NaCl-Lösung und 100 µL 99 %iges Isopropanol zu den 100 µL DNA-Lösung gegeben. Nach Mischen durch kurzes Vortexen der Lösung und anschließendem Ruhen für 5 min wurde die ausgefällte DNA durch Zentrifugation für 15 min bei 13000 U/min abgetrennt und der Überstand sehr vorsichtig verworfen. Die DNA wurde mit 1 mL 70 %igem Isopropanol gewaschen, für 15 min bei 13000 U/min erneut zentrifugiert und ca. 80 % des Überstandes wurden verworfen. Das restliche Lösungsmittel wurde durch Trocknen bei RT schonend verdampft. Abschließend wurde die DNA in 20 µL EB-Puffer erneut gelöst und die Konzentration mittels Nanodrop bestimmt.

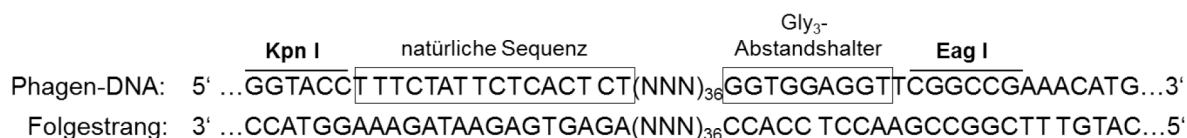
### **Sequenzierung der Phagen-DNA**

Die Sequenzanalyse der Phagen-DNA wurde durch die Firma StarSEQ GmbH (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden in 0,2 mL PCR-Gefäßen je 600 ng DNA mit Millipore-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 6 µL aufgefüllt und mit 1 µL des DNA-Primers -96gIII

(5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3') mit einer Konzentration von 1 pmol/μL in Wasser versetzt.

### Erhaltene Phagen-Sequenzen

Zur Analyse der Sequenzen wurden die natürlichen Schnittstellen **Kpn I** und **Eag I** in der erhaltenen DNA-Sequenz ermittelt, welche die eingebaute randomisierte Sequenz erfassen (Abbildung 6.1). Dabei ist zu beachten, dass durch die Sequenzierung der jeweilige Folgestrang der DNA erhalten wurde. Nach Identifizierung des zusätzlich eingefügten Gly<sub>3</sub>-Abstandshalters und der natürlichen Sequenz AGAGTGAGAATAGAAA wurde die randomisierte 36-mer DNA wieder in den Leitstrang überführt und anschließend übersetzt. Tabelle 6.3 fasst alle erhaltenen DNA-Fragmente zusammen.



**Abbildung 6.1.** Ausschnitt der zirkulären Einzelstrang-DNA eines modifizierten M13 Bakteriophagen mit insertierter randomisierter 12-mer Sequenz und der dazugehörige Folgestrang; N = A, G, C oder T.

**Tabelle 6.3.** Zusammenfassung aller Sequenzierungsergebnisse und der daraus erhaltenen DNA-Sequenzen (Folgestrang); **Kpn I** und **Eag I** Schnittstellen sind fett markiert, flankierende Bereiche der randomisierten Sequenz sind unterstrichen; <sup>1</sup> Mutation mit nur zwei C-terminalen Gly.

erhaltene DNA-Sequenz in 5'→3'	Pepitd	Häufig- keit	Protokoll (Runde)
<b>CGGCCGA</b> <u>AACCTCCACCA</u> ACAAAAGTAGTCCTAGAAAG AGGAATACCACCCTGAGAGTGAGAATAGAA <b>GGTACC</b>	QGGIPLSRTTFV	1	C1 (3)
<b>CGGCCGA</b> <u>AACCTCCACCC</u> GCCTTCAAACAAATCCCCGAA CAACCAAACAACGAAGAGTGAGAATAGAA <b>GGTACC</b>	SLFGCSGICLKA	1	C1 (3)
<b>CGGCCGA</b> <u>AACCTCCACCC</u> CGCATAAGCGAACCATGCCCC GCATTCGGATGCATAGAGTGAGAATAGAA <b>GGTACC</b>	MHPNAGHGSLMR	3	C1 (3, 4)
<b>CGGCCGA</b> <u>AACCTCCACCA</u> GGCTGCGTACGCAGATTCAA AGACGGAAACGCAGCAGAGTGAGAATAGAA <b>GGTACC</b>	AAFPSLNLRTQP	1	C1 (3)
<b>CGGCCGA</b> <u>AACCTCCACCC</u> CAATCCCCGGCTTCAGCACC GAATTACCATCCCCAGAGTGAGAATAGAA <b>GGTACC</b>	GDGNSVLKPGNW	1	C1 (3)
<b>CGGCCGA</b> <u>AACCTCCACCC</u> GGCGGAAAAATAATGCATAGC AGTATCACCAGGCTTAGAGTGAGAATAGAA <b>GGTACC</b>	KPGDTAMHYFPP	1	C1 (3)
<b>CGGCCGA</b> <u>AACCTCCACCA</u> ACAACAAGAATAGCAGCCTT	TSTNGKAAILVV	1	C1 (3)

CCCATAGTACTCGTAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>			
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCCTCACCAGACTCAAACCAAAA</u> ATTATGACTCCTATCAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	DRSHNFWFESGE	1	C1 (3)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCCTCCTCAAAGGATAAGTACG</u> CGCCTGCTCATCCCAAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	WDEQARTYPLRS	1	C1 (3)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCCCATATGAACATGAAGAACC</u> CGAGACGTCGAAGAAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	GVILVLLGLCSF	1	C1 (4)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCACAAGCGAACCTTCTGCCAA</u> AAAGACTGCGGAGTAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	TPQSFQKGSV	1	C1 (4)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCCTGCACAAAAACATTACTCCGA</u> ACAGCAACCGGAGAAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	SPVAVRSNVFVQ	1	C1 (4)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCAGAATGACTCAACGGAAGAAC</u> ACCAACAGGAACCTTAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	KVPVGVLP LSHS	1	C1 (4)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCAGAAGGCCAAAACCCACTCGG</u> AGAACCACTAGCCTTAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	KASGSPSGFWPS	1	C1 (4)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCAATCCAATGAGCCTTAGGCATA</u> TGCTTAACAGGCATAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	MPVKHMPKAHWI	1	C1 (4)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCACGACGATAATTAATATGAGTA</u> TCCATAGAAAAATCAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	DFSMDTHINYRR	1	C1 (4)
<b>CGGCCG</b> <u>AGTGAGAATAGAAA<b>GGTACC</b></u>	ohne Insert	2	C1 (3, 4)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCCGAACGCGTACCATTCCACGTA</u> CGAATATCCTGACTAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	SQDIRTWNGTRS	1	T1 (3)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCCGTAAACAGTACCACTCCCCGCC</u> TGCGACGTAGGAACAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	VPTSQAGSGTVT	1	T1 (3)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCATGCTGCCAATCATACGCAACC</u> TTATACACACCACTAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	SGVYKVAYDWQH	2	T1 (3, 4)
<b>CGGCCG</b> <u>AGTGAGAATAGAAA<b>GGTACC</b></u>	ohne Insert	16	T1 (3, 4)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACTATGCCAAAGCTCCGCATCCCC</u> ATTAACCGGAAGAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b> <sup>1</sup>	LPVNGDAELWHS	9	T2 (3, 4)
<b>CGGCCG</b> <u>AGTGAGAATAGAAA<b>GGTACC</b></u>	ohne Insert	1	T2 (3, 4)
-	DNA nicht lesbar	7	T2 (3, 4)
GCAGCTCCACGCCTTGATGATCCATTGCATGGGTAGG ACTTGTTCTACCAATACGAATATCTCCGGAAAGTGAAC	Wildtyp DNA	1	T2 (3,)
TTACGCCCAACCCCTTTCCCCCTCCCAAACCCCATATA	Wildtyp DNA	1	T2 (3,)

ACCGAACCAAAGGAACAATAACGCCCCCTTCCTAAC			
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACCC</u> CTCGGAGGAGTATTACCAGTA AACGACAAACCCGCAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	AGLSFTGNTPPR	1	T3 (2)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACC</u> ATGACCATAATTCGAATGCGTA AACGTCAAAACAGTAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	TVLTFTHSNYGH	1	T3 (2)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACC</u> AGCCCCATTCGTAGTACGAACA AACCGCACCTCCTGAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	QEVRFVRTTNGA	1	T3 (2)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACC</u> CGAGCCAAACGCACAGTCCCA CTCCAAACAAATTAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	NLFGSGTVRLAA	1	T3 (2)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACC</u> ATGCAAATACAGATTAGTAGCC GAAGTATGCAAACCAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	GLHTSATNLYLH	5	T3 (3, 4)
<b>CGGCCG</b> <u>AACCTCCACC</u> ATGCTGCCAATCATAACGCAACC TTATACACACCACTAGAGTGAGAATAGAAA <b>GGTACC</b>	SGVYKVAYDWQH	1	T3 (4)
<b>CGGCCG</b> <u>GAGTGAGAATAGAAA</u> <b>GGTACC</b>	ohne Insert	20	T3 (2, 3, 4)

### Analyse der erhaltenen Phagen Sequenzen

Tabelle 6.4 bzw. Tabelle 6.5 zeigen Anreicherungen bestimmter AS abhängig von ihrer Position in der Peptidsequenz aus dem Cellulose bzw. Toner Screening. Die einzelnen AS wurden dafür nach ihrer Seitenkettenfunktionalität in Gruppen eingeteilt (unpolar, polar, sauer, basisch und aliphatisch, aromatisch, S-haltig, amidiert, hydroxyliert). Es sind jeweils nach der Häufigkeit der Sequenzen gewichtete und nicht gewichtete Ergebnisse gegenüber gestellt.

# EXPERIMENTELLER TEIL

**Tabelle 6.4.** Anreicherungen bestimmter AS abhängig von ihrer Position in den Peptidsequenzen des Cellulose Screenings; gew.: gewichtet (mehrfach auftretende Sequenzen zählen entsprechend ihrer Häufigkeit), n. gew.: nicht gewichtet (mehrfach auftretende Sequenzen zählen einmal).

Aminosäure- Seitenkettenfunktionalität	Position											
	1		2		3		4		5		6	
	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.
unpolar (A,V,M,L,I,P,W,F)	6	4	<b>10</b>	<b>10</b>	9	7	6	6	8	6	<b>10</b>	<b>10</b>
polar (C,Y,S,T,N,Q,G)	7	7	2	2	8	<b>8</b>	<b>9</b>	7	8	<b>8</b>	5	3
sauer (D,E)	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	1	1	1	1	1	1	0	0
basisch (K,R,H)	3	3	4	2	0	0	2	2	1	1	3	3
aliphatisch (A,I,L,M,P,V)	5	3	<b>9</b>	<b>9</b>	7	7	6	6	7	5	8	8
aromatisch (W,F,Y,H)	1	1	4	2	2	2	1	1	2	2	2	2
S haltig (M,C)	<b>4</b>	<b>2</b>	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
amidiert (Q, N)	1	1	0	0	1	1	<b>6</b>	<b>4</b>	1	1	0	0
hydroxyliert (S,Y,T)	4	4	1	1	4	4	1	1	4	4	2	2
Gly	2	2	1	1	3	<b>3</b>	2	2	2	2	3	1
häufigste AS (Häufigkeit)	<b>M (4)</b>	<b>K (3)</b>	<b>P (4)</b>	<b>P (4)</b>	<b>P (4)</b>	<b>S, G (3)</b>	<b>N (5)</b>	<b>N (3)</b>	<b>A (4)</b>	<b>S (3)</b>	<b>L, G (3)</b>	<b>L (3)</b>

Aminosäure- Seitenkettenfunktionalität	Position											
	7		8		9		10		11		12	
	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.
unpolar (A,V,M,L,I,P,W,F)	7	7	6	6	8	8	9	7	<b>10</b>	8	9	9
polar (C,Y,S,T,N,Q,G)	7	7	7	5	8	6	8	<b>8</b>	4	4	4	4
sauer (D,E)	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
basisch (K,R,H)	4	2	<b>5</b>	<b>5</b>	1	1	1	1	4	4	4	2
aliphatisch (A,I,L,M,P,V)	6	6	5	5	7	7	6	4	8	6	7	7
aromatisch (W,F,Y,H)	<b>5</b>	3	3	3	2	2	<b>5</b>	<b>5</b>	3	3	2	2
S haltig (M,C)	1	1	0	0	1	1	1	1	3	1	0	0
amidiert (Q, N)	2	2	1	1	1	1	0	0	2	2	1	1
hydroxyliert (S,Y,T)	4	4	1	1	5	3	<b>6</b>	<b>6</b>	1	1	3	3
Gly	1	1	<b>5</b>	<b>3</b>	1	1	1	1	1	1	0	0
häufigste AS (Häufigkeit)	<b>H (4)</b>	<b>S, L (3)</b>	<b>G (5)</b>	<b>G, K (3)</b>	<b>S (3)</b>	<b>P, L (2)</b>	<b>L (6)</b>	<b>L (4)</b>	<b>M (3)</b>	<b>R, V, P (2)</b>	<b>R (4)</b>	<b>V, S, (3)</b>

**Tabelle 6.5.** Anreicherungen bestimmter AS abhängig von ihrer Position in den Peptidsequenzen des Toner Screenings; gew.: gewichtet, n. gew.: nicht gewichtet.

Aminosäure-Seitenkettenfunktionalität	Position											
	1		2		3		4		5		6	
	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.
unpolar (A,V,M,L,I,P,W,F)	11	3	<b>17</b>	5	16	<b>6</b>	1	1	3	3	10	4
polar (C,Y,S,T,N,Q,G)	12	6	5	3	1	1	<b>21</b>	<b>7</b>	16	4	4	4
sauer (D,E)	0	0	1	<b>1</b>	1	<b>1</b>	0	0	0	0	<b>9</b>	<b>1</b>
basisch (K,R,H)	0	0	0	0	5	1	1	1	4	2	0	0
aliphatisch (A,I,L,M,P,V)	11	3	<b>17</b>	<b>5</b>	15	<b>5</b>	1	1	0	0	10	4
aromatisch (W,F,Y,H)	0	0	0	0	6	2	3	1	3	3	0	0
S haltig (M,C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
amidiert (Q, N)	2	2	1	1	0	0	<b>9</b>	1	1	1	0	0
hydroxyliert (S,Y,T)	5	3	0	0	1	1	<b>11</b>	<b>5</b>	6	2	3	3
Gly	5	1	4	<b>2</b>	0	0	1	1	<b>9</b>	1	1	1
häufigste AS (Häufigkeit)	<b>L (9)</b>	<b>S (2)</b>	<b>P (10)</b>	<b>G, P, L (2)</b>	<b>V (13)</b>	<b>V (3)</b>	<b>N (9)</b>	<b>S, T (2)</b>	<b>G (9)</b>	<b>F (3)</b>	<b>D (9)</b>	<b>T (3)</b>

Aminosäure-Seitenkettenfunktionalität	Position											
	7		8		9		10		11		12	
	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.	gew.	n. gew.
unpolar (A,V,M,L,I,P,W,F)	13	3	1	1	14	2	14	4	8	4	2	2
polar (C,Y,S,T,N,Q,G)	8	4	13	<b>7</b>	5	5	9	5	5	3	11	3
sauer (D,E)	0	0	<b>9</b>	<b>1</b>	3	<b>1</b>	0	0	0	0	0	0
basisch (K,R,H)	2	2	0	0	1	1	0	0	<b>10</b>	2	<b>10</b>	<b>4</b>
aliphatisch (A,I,L,M,P,V)	12	2	1	1	14	2	2	2	8	4	2	2
aromatisch (W,F,Y,H)	2	2	3	1	0	0	<b>18</b>	<b>4</b>	9	1	9	3
S haltig (M,C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
amidiert (Q, N)	0	0	7	<b>3</b>	1	1	1	1	3	1	0	0
hydroxyliert (S,Y,T)	6	2	6	4	2	2	8	4	0	0	<b>11</b>	3
Gly	2	<b>2</b>	0	0	2	<b>2</b>	0	0	2	<b>2</b>	0	0
häufigste AS (Häufigkeit)	<b>A (12)</b>	<b>A, G, T (2)</b>	<b>E (9)</b>	<b>N (3)</b>	<b>L (14)</b>	<b>G, L, T (2)</b>	<b>W (12)</b>	<b>W, T, Y (2)</b>	<b>H (9)</b>	<b>G (2)</b>	<b>S (10)</b>	<b>H (3)</b>

## Protein-BLAST

Mittels eines mathematischen Suchvorgangs einer großen Protein Datenbank, einem so genannten Protein-BLAST der NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), wurden Übereinstimmungen der Sequenzen aus dem Cellulose Screening mit bekannten CBDs gesucht. Diese Suche wurde auf Proteine aus Bakterien eingeschränkt („taxid: 2“), die dem Schlagwort „*cellulose binding domain*“ zugeordnet werden konnten. Anschließend wurde geprüft, ob die gezeigten Übereinstimmungen innerhalb der CBD der Proteine lagen und nicht an anderer Stelle im Protein. Wenn dies der Fall war, wurde außerdem darauf geachtet, dass der so genannte E-Wert, ein Wert, der die statistische Wahrscheinlichkeit dieser Übereinstimmung anzeigt, unter 50 liegt.

## 6.5 Methoden und Ergebnisse

### EDX

EDX Messungen wurden parallel zu REM Aufnahmen aufgenommen, wobei jede Messung einen Bildausschnitt von ca. 15  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  repräsentiert. Tabelle 6.6 stellt die Ergebnisse der elementaren Zusammensetzungen von Druckerpapier und Filterpapier gegenüber.

**Tabelle 6.6:** EDX Ergebnisse zur elementaren Zusammensetzung von handelsüblichem Druckerpapier im Vergleich zum verwendeten Filterpapier.

Atom-%	C	N	O	Si	Ca
<b>Druckerpapier_1</b>	41,65 $\pm$ 3,5	1,3 $\pm$ 1,1	43,8 $\pm$ 4,7	4,14 $\pm$ 0,3	9,11 $\pm$ 0,4
<b>Druckerpapier_2</b>	41,11 $\pm$ 3,1	1,79 $\pm$ 1,3	42,86 $\pm$ 4,2	4,63 $\pm$ 0,3	9,61 $\pm$ 0,4
<b>Druckerpapier_3</b>	51,66 $\pm$ 4,3	2,05 $\pm$ 1,9	37,91 $\pm$ 4,7	2,39 $\pm$ 0,2	6 $\pm$ 0,3
<b>Mittelwert Druckerpapier</b>	<b>44,8 <math>\pm</math> 3,6</b>	<b>1,7 <math>\pm</math> 1,4</b>	<b>41,5 <math>\pm</math> 4,5</b>	<b>3,7 <math>\pm</math> 0,3</b>	<b>8,2 <math>\pm</math> 0,4</b>
<b>Filterpapier_1</b>	52,53 $\pm$ 13,6	4,21 $\pm$ 9	40,11 $\pm$ 14,8	1,01 $\pm$ 0,3	2,13 $\pm$ 0,6
<b>Filterpapier_2</b>	59,54 $\pm$ 11,9	2,44 $\pm$ 5,3	36,34 $\pm$ 11,3	0,7 $\pm$ 0,2	0,98 $\pm$ 0,3
<b>Filterpapier_3</b>	53,44 $\pm$ 13	5,38 $\pm$ 9,2	38,56 $\pm$ 14,1	0,48 $\pm$ 0,2	2,14 $\pm$ 0,6
<b>Mittelwert Filterpapier</b>	<b>55,2 <math>\pm</math> 12,8</b>	<b>4,0 <math>\pm</math> 7,8</b>	<b>38,3 <math>\pm</math> 13,4</b>	<b>0,7 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>1,6 <math>\pm</math> 0,5</b>

### Oberflächenberechnung

Die spezifischen Oberflächen von Cellulosepulver und Filterpapier wurde durch N<sub>2</sub>-Adsorption nach BRUNAUER, EMMETT UND TELLER ermittelt. Die Proben wurden vor der Messung für 17 h bei 50 °C am Vakuum ausgeheizt. Die Messungen erfolgten bei 77 K unter steigendem Druck. Ebenfalls wurde zweimal versucht, die BET Oberfläche des Toners zu ermitteln, allerdings ließen die Messwerte hierbei keine verlässliche Auswertung zu (vgl. Korrelationskoeffizienten in Tabelle 6.7).

**Tabelle 6.7.** Ergebnisse der Messungen der BET-Oberflächen von Cellulosepulver, Filterpapier und Toner nach Auswertung durch die geräteeigene Software.

	relativer Druck [p/p°]	Adsorbierte Menge (cm <sup>3</sup> /g STP)	1/[Q(p°/p-1)]
<b>Cellulose</b>	0,0525	0,2101	0,2639
	0,0699	0,2243	0,3350
	0,1201	0,2549	0,5354

# EXPERIMENTELLER TEIL

	0,1504	0,2693	0,6573
	0,1898	0,2851	0,8216
	0,2203	0,2973	0,9503
<b>BET Oberfläche (Korrelationskoeffizient)</b>	<b>1,0547 ± 0,0059 m<sup>2</sup>/g (0,9999)</b>		
<b>Filterpapeir</b>	0,0529	0,1338	0,4173
	0,0699	0,1475	0,5099
	0,1201	0,1830	0,7462
	0,1502	0,1957	0,9034
	0,1904	0,2105	1,1170
<b>BET Oberfläche (Korrelationskoeffizient)</b>	<b>0,8386 ± 0,0120 m<sup>2</sup>/g (0,9997)</b>		
<b>Toner_1</b>	0,0526	0,0072	7,7143
	0,0702	0,0088	8,5679
	0,1899	0,0135	17,3236
	0,2202	0,0140	20,1152
	0,2668	0,0139	26,2682
	0,2933	0,0134	31,0554
<b>BET Oberfläche (Korrelationskoeffizient)</b>	<b>0,0466 ± 0,0042 m<sup>2</sup>/g (0,9839)</b>		
<b>Toner_2</b>	0,0528	0,0145	3,8585
	0,0700	0,0159	4,7301
	0,1202	0,0270	5,0683
	0,1504	0,0319	5,5409
	0,1903	0,0325	7,2250
	0,2199	0,0298	9,4646
	0,2669	0,0294	12,3996
<b>BET Oberfläche (Korrelationskoeffizient)</b>	<b>0,1142 ± 0,0173 m<sup>2</sup>/g (0,9449)</b>		

Daher wurde die Oberfläche der für die Adsorptionsversuche verwendeten Tonerpartikel (aufgeschmolzen und anschließend manuell zerkleinert) näherungsweise berechnet. Dafür wurde eine Mikroskopaufnahme der Partikel herangezogen und in einem Bildausschnitt wurden mittels einer Bildbearbeitungssoftware (IMAGE J) mehrere Partikel ausgemessen und eine durchschnittliche Kantenlänge ermittelt sowie unter der vereinfachten Annahme einer Würfelform näherungsweise die Oberfläche berechnet. Es ergab sich eine durchschnittliche Oberfläche von



1,2 mm<sup>2</sup>. Bei ca. 50 Partikeln pro 1 mg Toner ergibt sich daraus eine spezifische Oberfläche von ca.  $0,06 \pm 0,02$  g/m<sup>2</sup>.

**Tabelle 6.8.** Ermittelte Kantenlängen für 50 verschiedene Tonerpartikel und näherungsweise ermittelte Oberflächen unter Annahme eines Würfels sowie daraus berechnete Mittelwerte.

Partikel	Kantenlänge [μm]	Oberfläche [mm <sup>2</sup> ]	Partikel	Kantenlänge [μm]	Oberfläche [mm <sup>2</sup> ]
1	402,5	1,0	26	251,6	0,4
2	540,9	1,8	27	264,2	0,4
3	962,3	5,6	28	1012,6	6,2
4	358,5	0,8	29	792,5	3,8
5	188,7	0,2	30	113,2	0,1
6	1176,1	8,3	31	182,4	0,2
7	257,9	0,4	32	213,8	0,3
8	264,2	0,4	33	182,4	0,2
9	276,7	0,5	34	195,0	0,2
10	150,9	0,1	35	327,0	0,6
11	150,9	0,1	36	553,5	1,8
12	176,1	0,2	37	930,8	5,2
13	603,8	2,2	38	88,1	0,0
14	163,5	0,2	39	100,6	0,1
15	163,5	0,2	40	163,5	0,2
16	232,7	0,3	41	188,7	0,2
17	213,8	0,3	42	75,5	0,0
18	270,4	0,4	43	94,3	0,1
19	1050,3	6,6	44	434,0	1,1
20	113,2	0,1	45	176,1	0,2
21	144,7	0,1	46	176,1	0,2
22	572,3	2,0	47	125,8	0,1
23	320,8	0,6	48	138,4	0,1
24	301,9	0,5	49	1081,8	7,0
25	402,5	1,0	50	88,1	0,0
<b>Mittelwert</b>				<b>348,2</b>	<b>1,2</b>

## Peptidsynthese

### Automatisierte Festphasenpeptidsynthese

Die Festphasenpeptidsynthese wurde automatisiert nach Standard Fmoc-Strategie an einem festen Träger in NMP durchgeführt. Ein Kupplungszyklus setzte sich aus den folgenden vier Arbeitsschritten zusammen: 1) Fmoc-Abspaltung, 2) waschen, 3) lösen und aktivieren der neuen Fmoc-Aminosäure-Derivate und 4) der Kupplung selbst. Es wurden Ansätze im 0,1 mmol Maßstab durchgeführt, wobei jeweils 10 Äquivalente der entsprechenden AS eingesetzt wurden. Als Festphasenträger zur Synthese der Peptide wurde ein Polystyrol Fmoc-Rinkamid Harz mit einer Beladung von 0,63 mmol/g oder ein TentaGel S RAM Harz mit einer Beladung von 0,24 mmol/g eingesetzt und zur Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate ein PEO-funktionalisiertes TentaGel PAP Syntheseharz (Beladung: PEO<sub>70</sub>: 0,24 mmol/g, PEO<sub>120</sub>: 0,17 mmol/g). Die Fmoc-Abspaltung erfolgte mit 20 % Piperidin in NMP (v/v). Zur Aktivierung der Aminosäuren wurde HBTU in NMP (51,2 g (135 mmol) in 300 mL) verwendet, wobei diese Reaktion basisch mit DIPEA (70 mL (402 mmol) in 130 mL NMP) katalysiert wurde. Die ersten 10 Aminosäuren wurden jeweils einfach gekuppelt, während ab der 11. AS Doppelkupplungen zur Steigerung der Ausbeute durchgeführt wurden, das heißt nach der Kupplung (Schritt 4) wurde kein neuer Zyklus gestartet, sondern ein weiteres Mal aktiviert und gekuppelt, um eine möglichst quantitative Umsetzung zu ermöglichen. Am Ende der Synthese wurde eine finale Entschützung der letzten Aminosäure durchgeführt, das Harz mit NMP gewaschen, in einen Spritzenreaktor überführt und 10-mal mit DCM gewaschen. Nach Trocknen im Vakuumschrank für mindestens vier Stunden folgte entsprechend die *N*-terminale Funktionalisierung oder direkt die Abspaltung der Peptide bzw. Konjugate.

### *N*-terminale Funktionalisierung mit Fluoreszenz- oder Raman-Marker

Alle folgenden Arbeiten mit Fluoreszenzfarbstoffen (FAM oder RhB) wurden im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen und damit verbundenen Verlust an Fluoreszenzintensität zu verhindern. Dafür wurden die Räumlichkeiten abgedunkelt und die verwendeten Reaktionsgefäße während des Arbeitens mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Kupplungen wurden im Spritzenreaktor direkt nach beendeter Peptidsynthese am Harz durchgeführt. Falls nötig, wurde das zuvor getrocknete Harz 30 min in NMP gequellt. Für eine möglichst quantitative Umsetzung wurden jeweils Doppelkupplungen nach **Tabelle 6.9** durchgeführt. Die Kupplungsreagenzien wurden in 3-5 mL NMP gelöst und es wurde 2-mal für mindestens 3 h im Spritzenreaktor bei RT

und 200 U/min geschüttelt. Zwischen beiden Kupplungen wurde das Harz 10-mal mit NMP gewaschen.

**Tabelle 6.9.** Zusammensetzungen der Kupplungslösungen im Verhältnis zur eingesetzten Menge Harz.

Kupplung	Marker	PyBop	NMM	DIPEA
FAM	10 Äq.	10 Äq.	20 Äqq.	-
RhB	10 Äq.	10 Äq.	-	20 Äq.
Cyanobenzoessäure	10 Äq.	10 Äq.	20 Äq.	-

Abschließend wurde die Lösung verworfen, das Harz 10-mal mit NMP und 10-mal mit DCM gewaschen und über Nacht im Vakuumschrank getrocknet. Darauf folgte die Entschützung und Abspaltung vom Harz.

#### Entschützung und Abspaltung vom festen Träger

Die Abspaltung vom Harz und die Entschützung der Aminosäureseitenketten wurden gleichzeitig unter sauren Bedingungen durchgeführt.

##### *PS Fmoc-Rinkamid Syntheseharz (Peptide):*

Das Harz wurde 2-mal für 1 – 2 h mit 3 – 4 mL einer Mischung aus 50 % TFA, 45 % DCM und 5 % TES (v/v/v) im Spritzenreaktor bei RT und 200 U/min geschüttelt und anschließend 2-mal mit je 1 mL TFA gewaschen. Enthielt das Peptid Pbf-geschütztes Arginin wurde beim zweiten Abspalten eine Lösung aus 95 % TFA, 4 % H<sub>2</sub>O und 1 % TES eingesetzt. War jedoch Methionin im Peptid enthalten wurde 2-mal für 3 h mit 94 % TFA, 2,5 % TES, 2,5 % EDT und 1 % H<sub>2</sub>O abgespalten. Wenn nötig wurden die vereinigten TFA-Phasen auf 2 – 3 mL eingengt.

##### *TentaGel PAP Syntheseharz (Konjugate):*

Das Harz wurde für 30 – 60 min mit 2 – 3 mL einer Mischung aus 94 % TFA, 1 % TMSBr und 5 % Thioanisol (v/v/v) im Spritzenreaktor bei RT und 200 U/min geschüttelt und anschließend 2-mal mit je 1 mL TFA gewaschen. War jedoch Methionin im Peptid enthalten wurde 2-mal für 3 h mit 94 % TFA, 2,5 % TES, 2,5 % EDT und 1 % H<sub>2</sub>O abgespalten.

Die vereinigten TFA-Phasen wurden jeweils aus 45 mL kaltem Diethylether (-20 °C) gefällt und zentrifugiert (20 min bei 9000 U/min). Nachdem der Überstand abdekantiert wurde, wurde der Niederschlag erneut in 1 – 2 mL TFA gelöst, in kaltem Et<sub>2</sub>O gefällt, zentrifugiert und der

Überstand abdekantiert. Der Rückstand wurde schließlich im Vakuumtrockenschrank getrocknet, in Millipore-Wasser gelöst und lyophilisiert. Die Aufreinigung erfolgte entweder durch Dialyse mit 0,1 % Guanidinium Hydrochlorid (w/v) in Spectra/Por® Biotech Dialysemembranen (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegen Reinstwasser oder präparativ via HPLC.

### **MALDI-TOF MS**

Für massenspektrometrische Untersuchungen zur Synthesekontrolle wurden die Proben mit einer Konzentration von 0,1 mg/mL in 0,1 % TFA in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) gelöst. Als Matrix wurde  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymethylsäure ( $\alpha$ -CHCA) verwendet. Diese wurde mit einer Konzentration von 10 mg/mL ebenfalls in 0,1 % TFA in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) gelöst. Vor der Messung wurden je 1  $\mu$ L Probenlösung und 2  $\mu$ L Matrixlösung auf der MALDI-Platte vermischt und anschließend 1  $\mu$ L dieser Mischung abgenommen und erneut mit 2  $\mu$ L Matrixlösung gemischt. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, um insgesamt 3 Verdünnungsschritte zu erhalten. Die Proben wurden vor der Messung bei RT getrocknet.

### **Fluoreszenzmikroskopie**

Mikrokristallines Cellulosepulver, Filterpapier und kommerzielle nm-Tonerpartikel sowie Poly(styrol-*co*-butylacrylat) Extrakt und Syntheseprodukt wurden für erste Adsorptionsuntersuchungen 3-mal für je 10 min in verdünntem TBST Puffer (0,5 mM, pH 7,5) gewaschen und anschließend wurden je 3 mg mit 1 mL einer 0,1 mM Peptidlösung in verdünntem TBST Puffer (0,5 mM, pH 7,5) für 10 min bei RT und 250 U/min inkubiert. Nach 5-maligem Waschen für je 2 min wurde nach finaler Zentrifugation für 5 min bei 13000 U/min der Überstand verworfen und die Proben wurden in 10  $\mu$ L Reinstwasser resuspendiert. Dann wurden je 3  $\mu$ L dieser Suspension auf einen Objektträger pipettiert, möglichst gleichmäßig verteilt, bei RT getrocknet und schließlich am Fluoreszenzmikroskop vermessen.

Gedruckte Muster wurden für spätere Adsorptionsuntersuchungen auf bedrucktem Filterpapier nach Stabilisierung der Tonerbeschichtung durch PICUP untersucht. Dafür wurden die Muster in 500  $\mu$ L einer 1  $\mu$ M Lösung von <sup>RhB</sup>TBP1 in Citratpuffer (50 mM, pH 6,5) für 5 min in einem Schnappdeckel-Reaktionsgefäß inkubiert und anschließend dreimal für je 2 min mit CP gewaschen. Darauf folgte die Quervernetzung mittels PICUP, indem die inkubierten Muster in 500  $\mu$ L CP mit je 40  $\mu$ L einer 1 mM wässrigen Lösung von APS und Ru-bpy versetzt wurden. Die Belichtung, um die photokatalytische Reaktion zu starten, erfolgte für 2 s mit der Lichtquelle des unter Kapitel 6.3 beschriebenen Fluoreszenzmikroskops. Anschließend wurden die Muster mit 500  $\mu$ L einer 1  $\mu$ M Lösung von <sup>FAM</sup>CBP1 in verdünntem TBST Puffer (0,5 mM, pH 7,5) inkubiert und dreimal für je 2 min gewaschen. Die Proben wurden vor der Messung bei RT getrocknet.

### **Fluoreszenzspektroskopie**

Mikrokristalline Cellulose wurde ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt, während der Toner zuvor auf bis zu 200 °C aufgeheizt wurde, um den Fixierschritt während des Druckvorgangs zu simulieren. Dabei entsteht eine geschlossene Tonerfläche, die nach Abkühlen in kleinere Stücke im  $\mu\text{m}$ - bis  $\text{mm}$ -Bereich zerbrochen wurde, um die verfügbare Oberfläche zu erhöhen.

Es wurden, falls nicht anders beschrieben, jeweils 50 mg Substrat mit je 1 mL einer 10  $\mu\text{M}$  Lösung der jeweiligen fluoreszenzmarkierten Peptide bzw. Konjugate für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Substrate drei- bis fünfmal für je 2 min mit dem jeweiligen Puffer gewaschen. Durch Messung der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Überstände von Inkubations- und Waschlösungen lässt sich direkt auf die an den Substraten adsorbierte Menge Peptid schließen, wenn vorher die Fluoreszenzintensität der Stammlösung als 100 % festgelegt wird. Die Lösungen wurden vor den jeweiligen Messungen mindestens 1:10 verdünnt, um sicher zu stellen, dass bei den gemessenen Konzentrationen die Fluoreszenzintensität linear zur Peptidkonzentration im Überstand ist.

### **MALDI-TOF-MS-Bildgebung**

Für bildgebende MALDI Analysen an inkubiertem bedrucktem Papier wurden die Proben wie jeweils im Diskussionsteil beschrieben mit 0,1 – 1  $\mu\text{M}$  Lösungen der unmarkierten Peptide für je 5 – 10 min inkubiert und nach dreimaligem Waschen im entsprechenden Puffer und anschließendem Trocknen mittels beidseitigem Klebeband auf einem Objektträger fixiert. Dieser wurde in ein entsprechend angepasstes MALDI-Plate eingespannt und mittels Airbrush wurde die Matrix aufgetragen. Die Proben wurden je Messung in der jeweils angegebenen Auflösung Punkt für Punkt mit einem Laser abgerastert, wobei in regelmäßigen Abständen ein eigenständiges Massenspektrum an jedem einzelnen Punkt aufgenommen wurde.

Für spätere Adsorptionsuntersuchungen von bedrucktem Filterpapier nach der Stabilisierung der Tonerbeschichtung durch PICUP wurden die Muster in 500  $\mu\text{L}$  einer 1  $\mu\text{M}$  Lösung von TBP1 in Citratpuffer (50 mM, pH 6,5) für 5 min in einem Schnappdeckel-Reaktionsgefäß inkubiert und anschließend dreimal für je 2 min mit CP gewaschen. Darauf folgte die Quervernetzung mittels PICUP, indem die inkubierten Muster in 500  $\mu\text{L}$  CP mit je 40  $\mu\text{L}$  einer 1 mM wässrigen Lösung von APS und Ru-bpy versetzt wurden. Die Belichtung zum Start der photokatalytischen Reaktion erfolgte für 2 s mit der Lichtquelle des unter Kapitel 6.3 beschriebenen Fluoreszenzmikroskops. Anschließend wurden die Muster mit 500  $\mu\text{L}$  einer 1  $\mu\text{M}$  Lösung von CBP1 in verdünntem TBST Puffer (0,5 mM, pH 7,5) inkubiert und dreimal für je 2 min gewaschen. Die Proben wurden vor der Fixierung auf einem Objektträger bei RT getrocknet.

## Langmuir-Isothermen

Zur Messung der Langmuir-Isothermen an einzelnen Substraten wurden je 3 mg Cellulose, 4 mg Filterpapier bzw. 25 mg Toner für 10 min mit 1  $\mu$ M bis 25  $\mu$ M Stammlösungen der Peptide bzw. Konjugate inkubiert. Messungen an Cellulose und Filterpapier wurden in TBST Puffer (0,5 mM, pH 7,5), Messungen an Toner in Citratpuffer (50 mM, pH 6,5) durchgeführt.

Nach der linearen, reziproken Auftragung der Langmuir-Isothermen in Abhängigkeit von der Konzentration  $c$  wurden lineare Funktionen aus den Messwerten ermittelt. Diese ergaben nach Gl. 5 und 6 die Langmuir-Konstante und eine theoretische Stoffmenge für eine Monolage Peptid oder Konjugat  $n_{mono}$  auf der Substratoberfläche. Dabei wurde die folgende reziproke Form der Langmuir-Isotherme  $\theta = n/n_{mono}$  zu Grunde gelegt:

$$\frac{1}{n} = \frac{1}{n_{mono} \cdot c \cdot K_L} + \frac{1}{n_{mono}} \quad (\text{Gl. 4})$$

mit

$$a = \frac{1}{n_{mono} \cdot K_L} \quad \text{und} \quad b = \frac{1}{n_{mono}} \quad (\text{Gl. 5 \& 6})$$

**Tabelle 6.10.** Aus den Langmuir-Isothermen ermittelte Werte  $a$  und  $b$  entsprechend Gl. 5 und 6.

Substrat	Peptid	$a$ [ $\mu$ M/nmol]	$b$ [1/nmol]
Cellulose	<sup>FAM</sup> CBP1	3,8	0,1
	<sup>FAM</sup> CBP1 <sub>MIX</sub>	4,0	0,0
	<sup>FAM</sup> CBP1-PEO <sub>70</sub>	5,6	0,3
Filterpapier	<sup>FAM</sup> CBP1	4,6	0,2
	<sup>FAM</sup> CBP1 <sub>MIX</sub>	4,2	0,3
	<sup>FAM</sup> CBP1-PEO <sub>70</sub>	4,6	0,5
Toner	<sup>FAM</sup> TBP1	2,6	0,1
	<sup>FAM</sup> TBP1 <sub>MIX</sub>	2,4	0,1
	<sup>FAM</sup> TBP1-PEO <sub>70</sub>	3,2	1,1

## Postfunktionalisierung mit <sup>RhB</sup>GGG-PTAD\* und <sup>RhB</sup>GG(DDRK)<sub>2</sub>GGG-PTAD\*

<sup>RhB</sup>GGG-PTAD\* und <sup>RhB</sup>GG(DDRK)<sub>2</sub>GGG-PTAD\* wurden zur Postfunktionalisierung direkt nach der Aktivierung und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Zu bedrucktem Filterpapier in 250  $\mu$ L H<sub>2</sub>O mit 20 % Acetonitril (v/v), das bereits mit TBP1 inkubiert und mittels PICUP

quervernetzt wurde, wurden 1,5  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Peptidlösungen pipettiert und für 3 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit CP für je 2 min, wurde die Probe bei RT getrocknet.

## 6.6 Synthese und Charakterisierung der eingesetzten Verbindungen

### 6.6.1 Poly(styrol-*co*-butylacrylat) Extraktion

35 mg schwarzer Toner (TN-3200) wurden in 300 mL THF suspendiert und für 2 h unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen auf RT wurde die Suspension auf mehrere 50-mL-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und für 20 min bei 9000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bis auf 40 mL am Vakuum verdampft, anschließend wurde die Lösung erneut für 20 min bei 9000 U/min zentrifugiert. Nach erneuter Filtration wurde das restliche Lösungsmittel am Vakuum entfernt und der erhaltene farblose Feststoff in 30 mL THF erneut gelöst. Unter starkem Rühren wurde die Lösung tropfenweise in 400 mL MeOH gegeben, um sauberes Polymer auszufällen. Der Überstand wurde abdekantiert und der farblose Feststoff über Nacht im Vakuumtrockenschrank getrocknet.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d$ ):  $\delta$  = 7,11 – 6,40 (m,  $\text{CH}_{\text{arom}}$  Styrol), 3,87 – 3,40 (m,  $\alpha\text{-CH}_2$  Bu-Acrylat), 2,38 – 1,18 (m,  $\beta\text{-CH}_2$  Bu-Acrylat,  $\gamma\text{-CH}_2$  Bu-Acrylat,  $\text{CH}_2$  Polymer Rückgrat, CH Styrol, CH Bu-Acrylat), 0,90 – 0,85 (m,  $\text{CH}_3$  Bu-Acrylat) ppm.

### 6.6.2 Poly(styrol-*co*-butylacrylat) Synthese

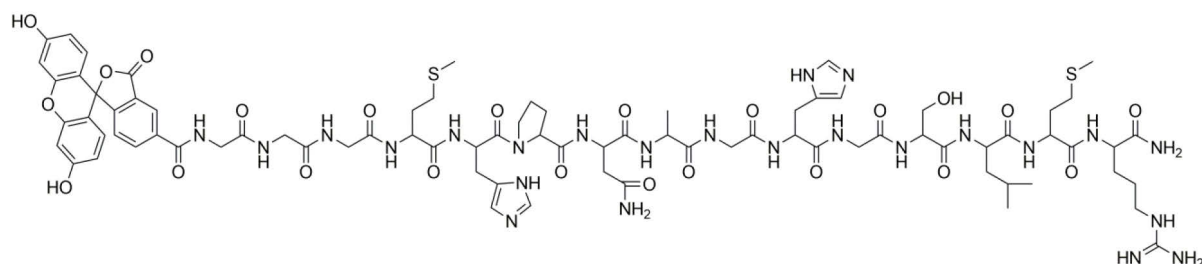
In einen ausgeheizten 500 mL 3-Hals-Kolben wurden unter Ar-Atmosphäre 68,5 mL (0,60 mol) Styrol, 14,2 mL (0,10 mol) *n*-Butylacrylat und 2,25 g (0,01 mol) 2,2'-Azobis(2-methylpropionitril) (AIBN) in 280 mL MeOH/*i*-Propanol (9:1, v/v) gelöst und bei 60 °C für 5 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf RT abgekühlt, weitere 15 h bei RT gerührt, filtriert und der feste Rückstand 3-mal mit je 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$ /MeOH (3:7, v/v) gewaschen und bei RT getrocknet.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d$ ):  $\delta$  = 7,25 – 6,39 (m,  $\text{CH}_{\text{arom}}$  Styrol), 3,86 – 3,45 (m,  $\alpha\text{-CH}_2$  Bu-Acrylat), 2,28 – 1,17 (m,  $\beta\text{-CH}_2$  Bu-Acrylat,  $\gamma\text{-CH}_2$  Bu-Acrylat,  $\text{CH}_2$  Polymer Rückgrat, CH Styrol, CH Bu-Acrylat), 0,90 – 0,86 (m,  $\text{CH}_3$  Bu-Acrylat) ppm.



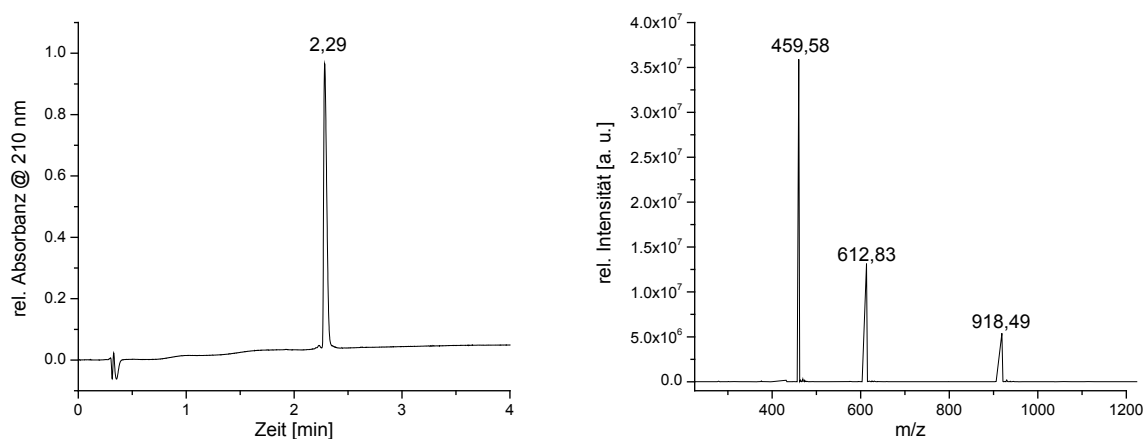


### 6.6.4 <sup>FAM</sup>CBP1 (<sup>FAM</sup>GGGMHPNAGHGSLMR)



<sup>FAM</sup>CBP1 wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem Rinkamid Harz synthetisiert und anschließend via HPLC präparativ aufgereinigt.

UPLC & ESI-MS      ber.:     $m/z = 459,69 [M+4H]^{4+}$ ,  $612,59 [M+3H]^{3+}$ ,  $918,37 [M+2H]^{2+}$   
                               gef.:     $m/z = 459,58 [M+4H]^{4+}$ ,  $612,83 [M+3H]^{3+}$ ,  $918,49 [M+2H]^{2+}$

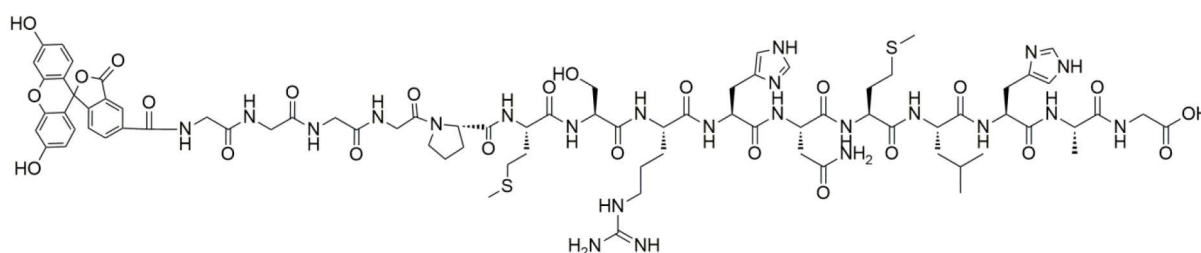


**Abbildung 6.3:** Analyse von <sup>FAM</sup>CBP1: links: UPLC-Untersuchung unter Verwendung eines Gradienten von 5 - 50 % Acetonitril in Reinstwasser innerhalb von 4 min ( $t_R = 2,29$  min), rechts: ESI-MS Spektrum ( $m/z = 459,58 [M+4H]^{4+}$ ,  $612,83 [M+3H]^{3+}$ ,  $918,49 [M+2H]^{2+}$ ).

MALDI-TOF-MS      ber.:     $m/z = 1837,00 [M+H]^+$ ,  $1858,99 [M+Na]^+$ ,  $1875,09 [M+K]^+$   
                               gef.:     $m/z = 1836,78 [M+H]^+$ ,  $1858,86 [M+Na]^+$ ,  $1874,84 [M+K]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol bestimmt werden.

### 6.6.5 <sup>FAM</sup>CBP1<sub>MIX</sub> (<sup>FAM</sup>GGGGPMSRHNMLHAG)

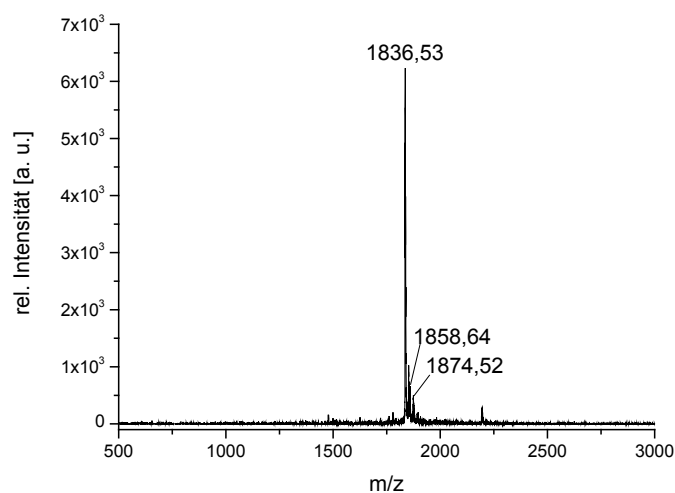


<sup>FAM</sup>CBP1<sub>MIX</sub> wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem Rinkamid Harz synthetisiert und anschließend mittels Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 1837,00 [M+H]^+$ ,  $1858,99 [M+Na]^+$ ,  $1875,09 [M+K]^+$

gef.:  $m/z = 1836,53 [M+H]^+$ ,  $1858,64 [M+Na]^+$ ,  $1874,52 [M+K]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol bestimmt werden.

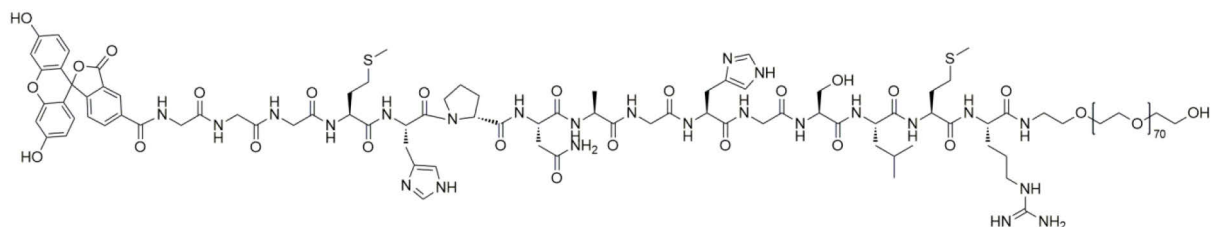


**Abbildung 6.4:** MALDI-TOF-MS Spektrum von <sup>FAM</sup>CBP1<sub>MIX</sub> ( $m/z = 1836,53 [M+H]^+$ ,  $1858,64 [M+Na]^+$ ,  $1874,52 [M+K]^+$ ).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d):  $\delta = 9,18 - 7,64$  (m, 13H,  $9 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  FAM,  $4 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  H),  $5,28 - 4,27$  (m, 21H,  $1 \times \text{CH}_2$  S,  $2 \times \text{CH}_2$  M,  $1 \times \text{CH}_2$  G,  $1 \times \text{CH}_2$  P,  $1 \times \text{CH}$  L,  $10 \times \text{CH}$  Peptid Rückgrat), 3,91 (s, 2H,  $1 \times \text{CH}_2$  G), 3,67 – 3,09 (m, 10H,  $2 \times \text{CH}_2$  P,  $3 \times \text{CH}_2$  G), 2,87 – 1,56 (m, 27H,  $2 \times \text{CH}_3$  M,  $1 \times \text{CH}_3$  A,  $3 \times \text{CH}_2$  R,  $2 \times \text{CH}_2$  M,  $2 \times \text{CH}_2$  H,  $1 \times \text{CH}_2$  N,  $1 \times \text{CH}_2$  L), 1,09 (dd,  $J = 20,4; 6,2$  Hz, 6H,  $2 \times \text{CH}_3$  Leu) ppm.

FT-IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3296,23 (s, Amid A, Amid B), 3042,17 (w), 2927,37 (w, C-H (v), Peptid), 1652,39 (vs, Amid I), 1532,02 (s, Amid II), 1429,13 (m, OH (Y)), 1247,90 (m; Amid III), 1178,66 (s, OH Phenol), 1131,16 (s, CO (v), RHC=CHR (Y) aromatisch), 835,25 (w, R<sub>2</sub>C=CHR (Y) aromatisch), 800,26 (w), 719,06 (w).

#### 6.6.6 <sup>FAM</sup>CBP1-PEO<sub>70</sub> (<sup>FAM</sup>GGGMHPNAGHGSLMR-PEO<sub>70</sub>)



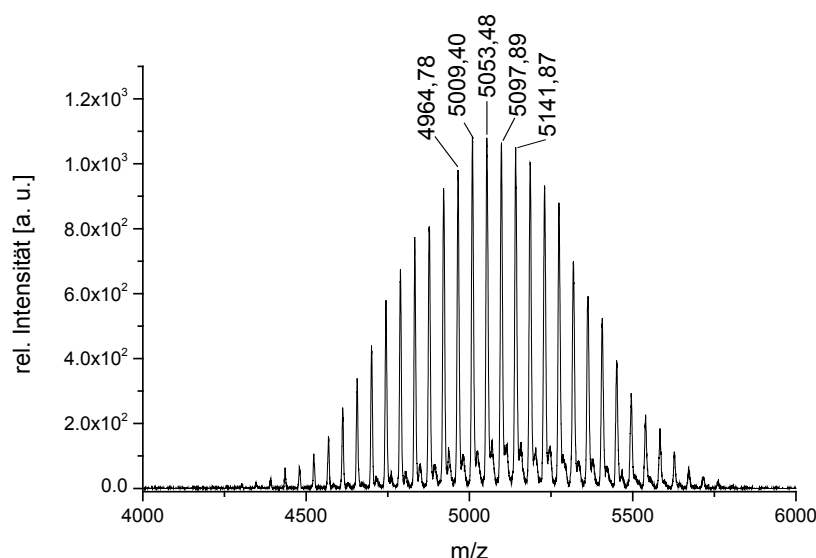
<sup>FAM</sup>CBP1-PEO<sub>70</sub> wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem TentaGel PAP Harz synthetisiert und anschließend mittels Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 5052,87 [M(^{FAM}CBP1-PEO_{73})+H]^+$

$\Delta m = 44,0$  (Ethylenoxid Wiederholungseinheiten)

gef.:  $m/z = 5053,48 [M(^{FAM}CBP1-PEO_{73})+H]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol zugeordnet werden.

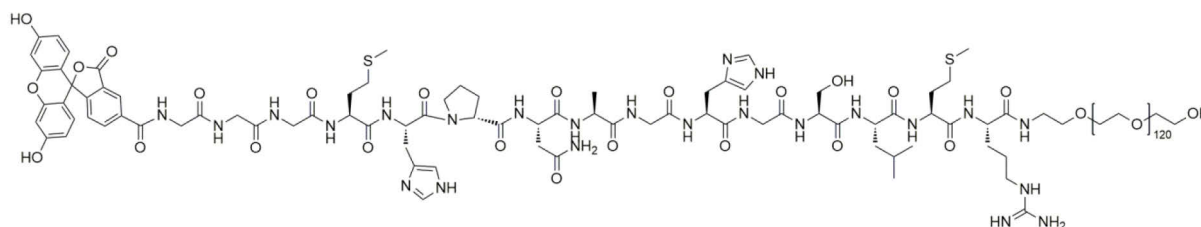


**Abbildung 6.5:** MALDI-TOF-MS Spektrum von  $^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{70}$  ( $m/z = 4964,78$  [ $\text{M}(^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{71})+\text{H}^+$ ],  $5009,40$  [ $\text{M}(^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{72})+\text{H}^+$ ],  $5053,48$  [ $\text{M}(^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{73})+\text{H}^+$ ],  $5097,89$  [ $\text{M}(^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{74})+\text{H}^+$ ],  $5141,87$  [ $\text{M}(^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{75})+\text{H}^+$ ]).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d$ ):  $\delta = 9,13 - 7,40$  (m, 13H,  $9 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  FAM,  $4 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  H),  $5,39 - 4,60$  (m, 18H,  $1 \times \text{CH}_2$  S,  $2 \times \text{CH}_2$  M,  $1 \times \text{CH}_2$  G,  $10 \times \text{CH}$  Peptid Rückgrat),  $4,48 - 3,64$  (m, 366H,  $4 \times \text{CH}_2$  G,  $179 \times \text{CH}_2$  PEO),  $3,42 - 1,77$  (m, 31H,  $2 \times \text{CH}_3$  M,  $3 \times \text{CH}_2$  R,  $3 \times \text{CH}_2$  P,  $4 \times \text{CH}_2$  M,  $1 \times \text{CH}_2$  N,  $1 \times \text{CH}_2$  L,  $1 \times \text{CH}$  L),  $1,64$  (d,  $J = 6,7$  Hz, 3H,  $1 \times \text{CH}_3$  A),  $1,05$  (dd,  $J = 18,1; 4,3$  Hz, 6H,  $2 \times \text{CH}_3$  Leu) ppm.

**FT-IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3291,53 (s; Amid A; Amid B), 3045,96 (w), 2886,04 (vs;  $\text{CH}_2$  (v) PEO; CH (v) Peptid), 1653,73 (s; Amide I), 1536,71 (m; Amid II), 1465,34 (m), 1342,09 (m; OH (Y)), 1279,60 (m; Amid III), 1240,12 (m; OH Phenol), 1100,94 (vs, CO (v) PEO), 959,25 (m;  $\text{RHC}=\text{CHR}$  (Y) aromatisch), 842,19 (m;  $\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$  (Y) aromatisch).

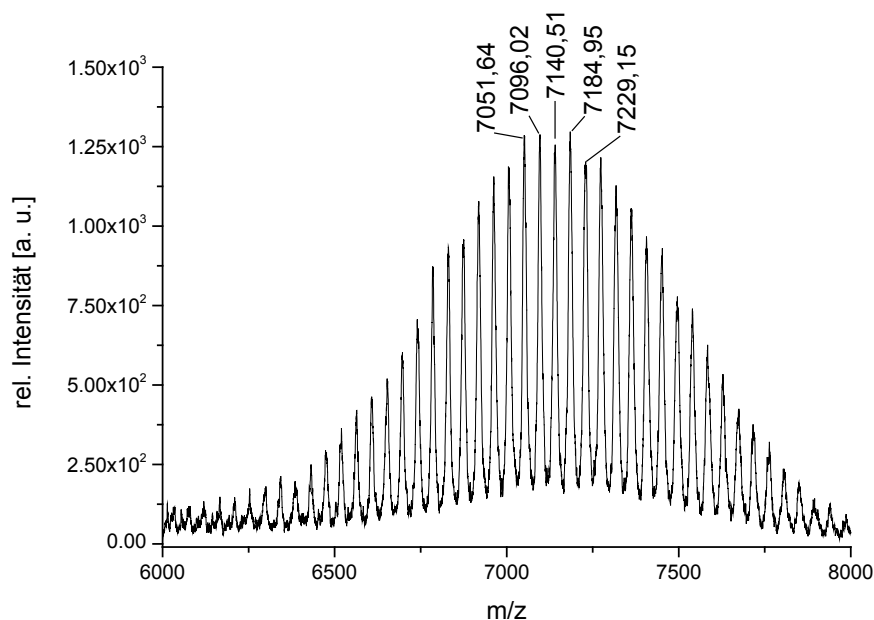
### 6.6.7 $^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{120}$ ( $^{\text{FAM}}\text{GGGMHPNAGHGSLMR-PEO}_{120}$ )



$^{\text{FAM}}\text{CBP1-PEO}_{120}$  wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem TentaGel PAP Harz synthetisiert und anschließend mittels Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 7140,84 [M(^{FAM}CBP1-PEO_{120})+Na]^+$   
 $\Delta m = 44,0$  (Ethylenoxid Wiederholungseinheiten)  
 gef.:  $m/z = 7140,51 [M(^{FAM}CBP1-PEO_{120})+Na]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol zugeordnet werden.

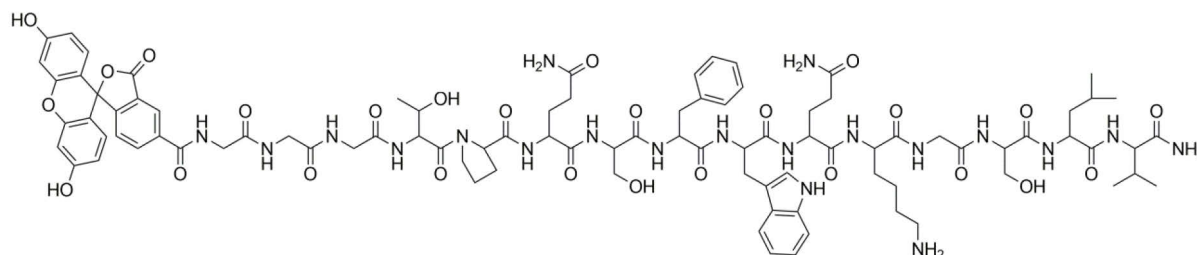


**Abbildung 6.6:** MALDI-TOF-MS Spektrum von  $^{FAM}CBP1-PEO_{120}$  ( $m/z = 7051,64 [M(^{FAM}CBP1-PEO_{118})+Na]^+$ ,  $7096,02 [M(^{FAM}CBP1-PEO_{119})+Na]^+$ ,  $7140,51 [M(^{FAM}CBP1-PEO_{120})+Na]^+$ ,  $7184,95 [M(^{FAM}CBP1-PEO_{121})+Na]^+$ ,  $7229,15 [M(^{FAM}CBP1-PEO_{121})+Na]^+$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz, TFA-d):  $\delta = 9,14 - 7,20$  (m, 13H,  $9 \times CH_{arom}$  FAM,  $4 \times CH_{arom}$  H),  $5,41 - 4,71$  (m, 14H,  $2 \times CH_2$  M,  $10 \times CH$  Peptid Rückgrat),  $4,61 - 3,54$  (m, 684H,  $1 \times CH_2$  S,  $5 \times CH_2$  G,  $336 \times CH_2$  PEO),  $3,42 - 3,01$  (m, 9H,  $2 \times CH_2$  M,  $1 \times CH_2$  N,  $1 \times CH_2$  R,  $1 \times CH$  L),  $2,81 - 1,50$  (m, 25H,  $2 \times CH_3$  M,  $1 \times CH_3$  A,  $2 \times CH_2$  R,  $3 \times CH_2$  P,  $2 \times CH_2$  M,  $1 \times CH_2$  L),  $1,04$  (d,  $J = 16,9$  Hz, 6H,  $2 \times CH_3$  Leu) ppm.

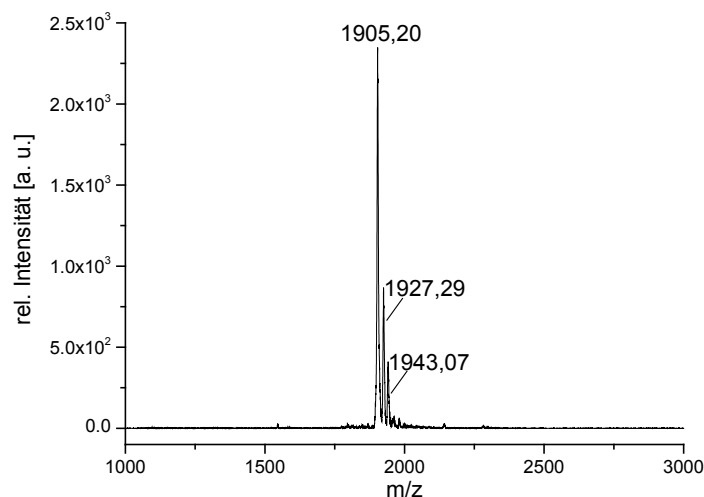
FT-IR:  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3286,10 (w; Amid A; Amid B), 2885,00 (vs;  $CH_2$  (v) PEO; CH (v) Peptid), 1662,73 (m; Amide I), 1536,85 (w; Amid II), 1465,95 (m), 1342,06 (m; OH (Y)), 1279,79 (m; Amid III), 1239,53 (m; OH Phenol), 1097,09 (vs, CO (v) PEO), 957,77 (s; RHC=CHR (Y) aromatisch), 841,59 (m;  $R_2C=CHR$  (Y) aromatisch).

### 6.6.8 <sup>FAM</sup>CBP2 (<sup>FAM</sup>GGGTPQSFQKGSV)



<sup>FAM</sup>CBP2 wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem Rinkamid Harz synthetisiert und anschließend durch Dialyse aufgereinigt.

**MALDI-TOF-MS** ber.:  $m/z = 1905,85 [M+H]^+, 1927,83 [M+Na]^+, 1943,80 [M+K]^+$   
 gef.:  $m/z = 1905,20 [M+H]^+, 1927,29 [M+Na]^+, 1943,07 [M+K]^+$



**Abbildung 6.7:** MALDI-TOF-MS Spektrum von <sup>FAM</sup>CBP2 ( $m/z = 1905,20 [M+H]^+, 1927,29 [M+Na]^+, 1943,07 [M+K]^+$ ).

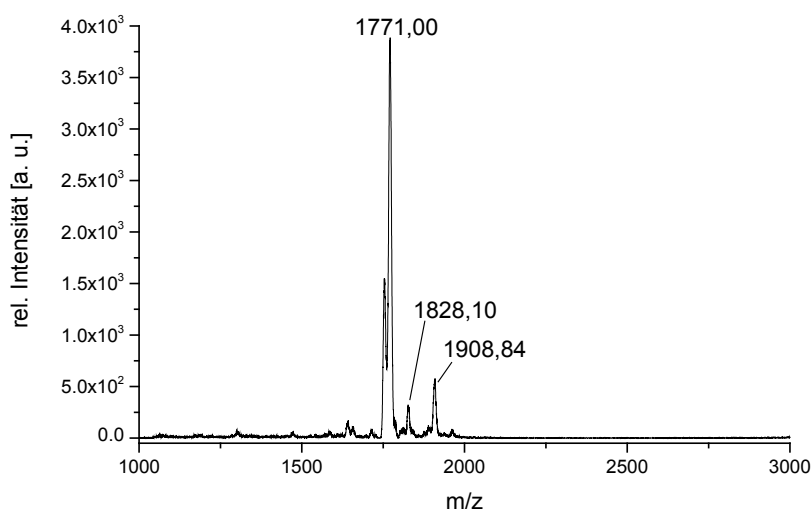
**ESI-MS** ber.:  $m/z = 953,43 [M+2H]^{2+}$   
 gef.:  $m/z = 954,19 [M+2H]^{2+}$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol bestimmt werden.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d):**  $\delta = 9,10 - 6,87$  (m, 19H,  $9 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  FAM,  $5 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  W,  $5 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  F),  $5,04 - 4,29$  (m, 22H,  $4 \times \text{CH}_2$  G,  $1 \times \text{CH}$  T,  $1 \times \text{CH}$  L,  $1 \times \text{CH}$  V,  $11 \times \text{CH}$  Peptid Rückgrat),  $4,29 - 3,99$  (m, 6H,  $1 \times \text{CH}_2$  K,  $2 \times \text{CH}_2$  S),  $3,40 - 3,22$  (m, 4H,  $2 \times \text{CH}_2$  Q),  $2,53 - 1,94$  (m, 16H,  $3 \times \text{CH}_2$  P,

Oc1ccc2c(c1)Oc3cc(OC(=O)NCC(=O)NCC(=O)NCC(=O)NCC(=O)NCC(=O)N[C@@H]4C(=O)N[C@H](O)C(=O)N4CC(=O)NCC(=O)N[C@@H]5C(=O)N[C@H](NC(=O)O[C@H](C)C)C(=O)N5C[C@@H]6C(=O)N[C@H](CCCCN)C(=O)N7C[C@H](C)CC7)ccc3O2)c4cc(O)ccc4

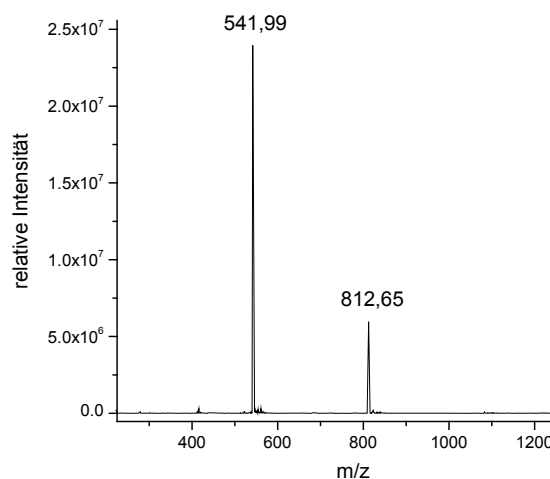
MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 1771,74 [M+H]^+$   
gef.:  $m/z = 1771,00 [M+H]^+, 1828,10 [M+Bu+H]^+,$   
 $1908,84 [M+2Bu+Na]^+$



**Abbildung 6.8:** MALDI-TOF-MS Spektrum von <sup>FAM</sup>CBP3 ( $m/z = 1771,00 [M+H]^+$ ).

<u>ESI-MS</u>	ber.:	$m/z = 886,88 [M+2H]^{2+}$
	gef.:	$m/z = 886,64 [M+2H]^{2+}$

124

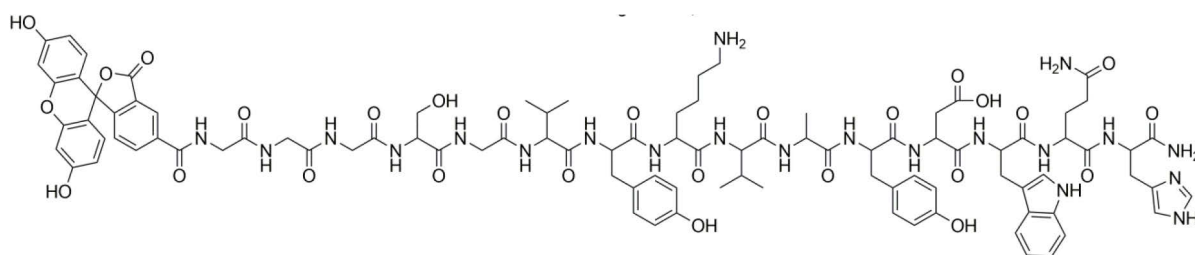
NC(=O)CCNC(=O)CCNC(=O)CCNC(=O)CC(O)C(=O)NCC(=O)NCC(=O)N(C)C(=O)NCC(=O)Nc1ccc(O)cc1C(=O)NCC(=O)NCC(=O)N(C)C(=O)NCC(=O)NCC(=O)N(C)C(=O)NCC(=O)Nc1ccc(O)cc1C(=O)NCC(=O)NCC(=O)Nc1c[nH]c2ccccc12C(=O)NCC(=O)NCC(=O)Nc1ccc2[nH]cnc12

gef.:  $m/z = 1623,13$   $[M+H]^+$

125



### 6.6.11 <sup>FAM</sup>TBP1 (<sup>FAM</sup>GGGSGVYKVAIDWQH)

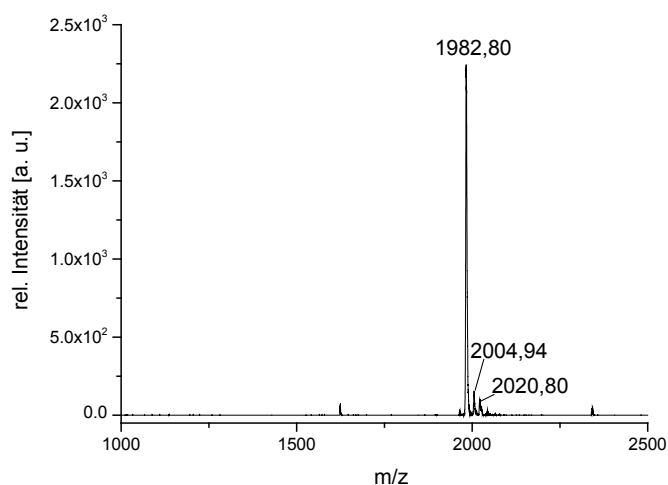


<sup>FAM</sup>TBP1 wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem Rinkamid Harz synthetisiert und anschließend durch Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 1982,07 [M+H]^+, 2004,05 [M+Na]^+, 2020,16 [M+K]^+$

gef.:  $m/z = 1982,80 [M+H]^+, 2004,94 [M+Na]^+, 2020,80 [M+Na]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol bestimmt werden.

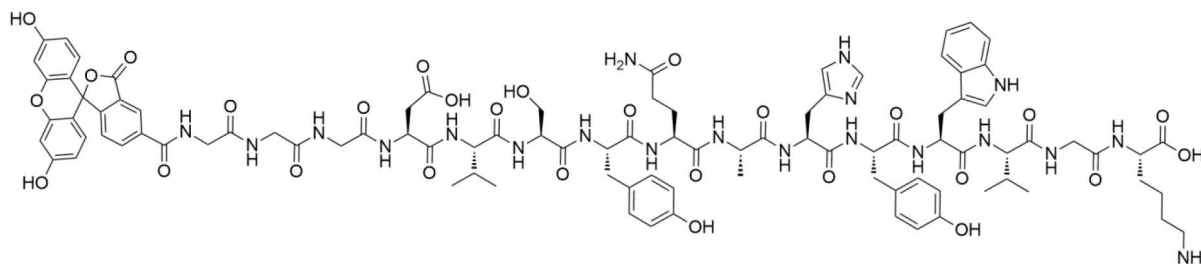


**Abbildung 6.10:** MALDI-TOF-MS Spektrum von <sup>FAM</sup>TBP1 ( $m/z = 1982,80 [M+H]^+, 2004,94 [M+Na]^+, 2020,80 [M+K]^+$ ).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d):  $\delta = 9,14 - 6,90$  (m, 24H,  $9 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  FAM,  $8 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  Y,  $2 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  H,  $5 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  W),  $5,18 - 4,34$  (m, 21H,  $4 \times \text{CH}_2$  G,  $2 \times \text{CH}$  V,  $11 \times \text{CH}$  Peptid Rückgrat),  $3,38 - 3,29$  (m, 4H,  $1 \times \text{CH}_2$  S,  $1 \times \text{CH}_2$  D),  $3,18 - 3,00$  (m, 8H,  $1 \times \text{CH}_2$  W,  $1 \times \text{CH}_2$  H,  $1 \times \text{CH}_2$  K,  $1 \times \text{CH}_2$  Q),  $2,50 - 2,18$  (m, 6H,  $1 \times \text{CH}_2$  Q,  $2 \times \text{CH}_2$  Y),  $1,67 - 1,52$  (m, 6H,  $3 \times \text{CH}_2$  K),  $1,14 - 1,06$  (m, 15H,  $4 \times \text{CH}_3$  V,  $1 \times \text{CH}_3$  A) ppm.

**FT-IR:**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3550,30 – 3010,50 (s; Amid A; Amid B), 2962,08 (m; C-H (v), Peptid), 1645,04 (s; Amid I), 1537,62 (m; Amid II), 1454,33 (m; OH (Y)), 1247,11 (m; Amid III), 1199,98 (m; OH Phenol), 1107,27 (vs, CO (v)), 994,30 (w; RHC=CHR (Y') aromatisch), 835,26 (w; R<sub>2</sub>C=CHR (Y') aromatisch).

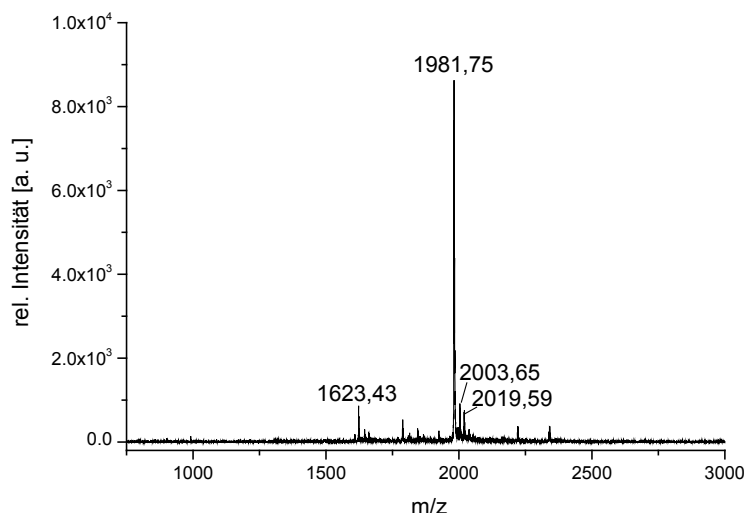
#### 6.6.12 <sup>FAM</sup>TBP1<sub>MIX</sub> (<sup>FAM</sup>GGGDVSYQAHYWVGK)



<sup>FAM</sup>TBP1<sub>MIX</sub> wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem Rinkamid Harz synthetisiert und anschließend mittels Dialyse aufgereinigt.

**MALDI-TOF-MS**      ber.:     $m/z = 1982,07 [M+H]^+$ ,  $2004,05 [M+Na]^+$ ,  $2020,16 [M+K]^+$   
                               gef.:     $m/z = 1981,75 [M+H]^+$ ,  $2003,65 [M+Na]^+$ ,  $2019,59 [M+K]^+$ ,  
     $1623,43 [M(TBP1_{MIX})+H]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol bestimmt werden.

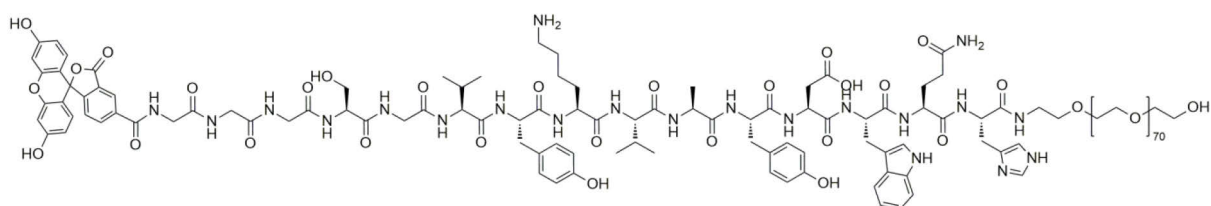


**Abbildung 6.11:** MALDI-TOF-MS Spektrum von <sup>FAM</sup>TBP1<sub>MIX</sub> ( $m/z = 1623,43$  [ $M(TBP1_{MIX})+H$ ]<sup>+</sup>,  $1981,75$  [ $M+H$ ]<sup>+</sup>,  $2003,65$  [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>,  $2019,59$  [ $M+K$ ]<sup>+</sup>).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d):  $\delta = 9,11 - 6,95$  (m, 24H,  $9 \times CH_{arom}$  FAM,  $8 \times CH_{arom}$  Y,  $2 \times CH_{arom}$  H,  $5 \times CH_{arom}$  W),  $5,27 - 3,94$  (m, 21H,  $4 \times CH_2$  G,  $2 \times CH$  V,  $11 \times CH$  Peptid Rückgrat),  $3,33 - 3,13$  (m, 12H,  $1 \times CH_2$  S,  $1 \times CH_2$  D,  $1 \times CH_2$  W,  $1 \times CH_2$  H,  $1 \times CH_2$  K,  $1 \times CH_2$  Q),  $2,69 - 1,50$  (m, 15H,  $1 \times CH_3$  A,  $1 \times CH_2$  Q,  $2 \times CH_2$  Y,  $3 \times CH_2$  K),  $1,15 - 1,03$  (m, 12H,  $4 \times CH_3$  V) ppm.

FT-IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 33277,65 (s; Amid A; Amid B), 3074,73 (w), 2945,67 (w; C-H (v), Peptid), 1622,40 (vs; Amid I), 1516,44 (s; Amid II), 1435,23 (w; OH (Y)), 1188,50 (m; Amid III), 1132,69 (m; OH Phenol), 1140,72 (vw, CO (v)), 994,50 (vw; RHC=CHR (Y) aromatisch), 833,80 (w; R<sub>2</sub>C=CHR (Y) aromatisch).

### 6.6.13 <sup>FAM</sup>TBP1-PEO<sub>70</sub> (<sup>FAM</sup>GGGSGVYKVAYDWQH-PEO<sub>70</sub>)



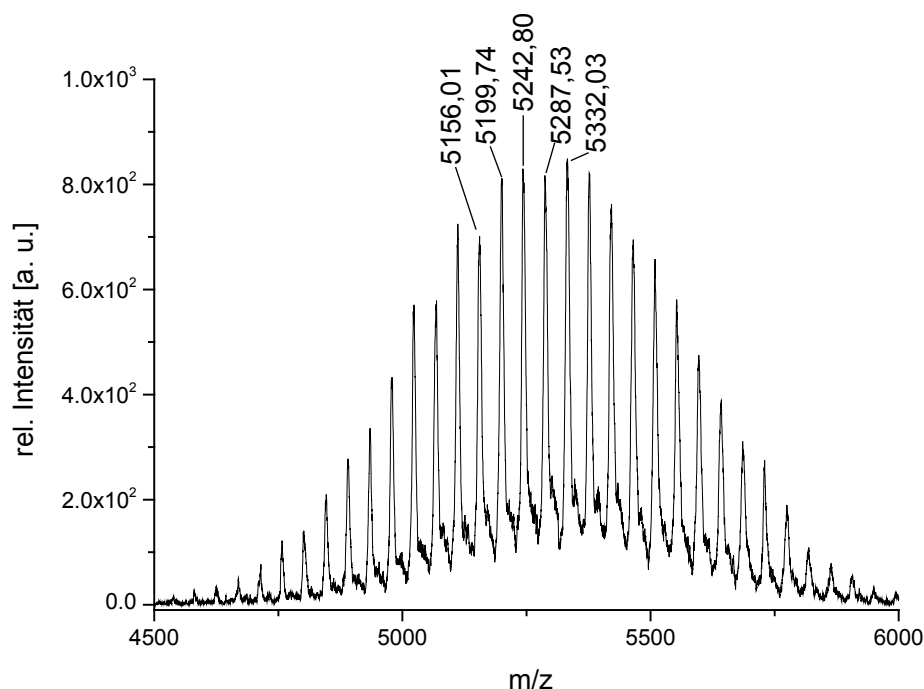
<sup>FAM</sup>TBP1-PEO<sub>70</sub> wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem TentaGel PAP Harz synthetisiert und anschließend mittels Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 5242,00$  [ $M(^{FAM}TBP1-PEO_{74})+H$ ]<sup>+</sup>

$\Delta m = 44,0$  (Ethylenoxid Wiederholungseinheiten)

gef.:  $m/z = 5242,80 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{74})+H]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol zugeordnet werden.

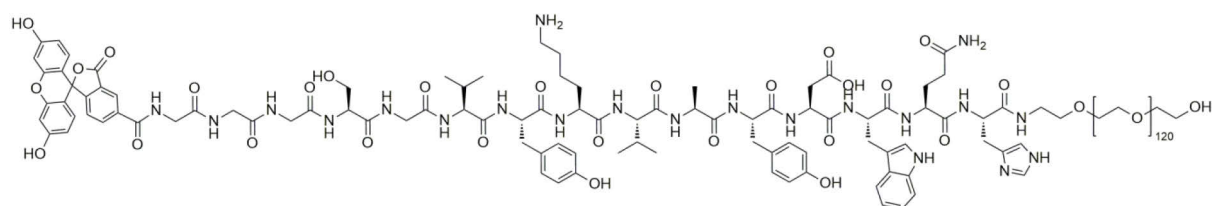


**Abbildung 6.12:** MALDI-TOF-MS Spektrum von  $^{FAM}TBP1-PEO_{70}$  ( $m/z = 5156,01 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{72})+H]^+$ ,  $5199,74 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{73})+H]^+$ ,  $5242,80 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{74})+H]^+$ ,  $5287,53 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{75})+H]^+$ ,  $5332,03 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{76})+H]^+$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz, TFA-d):  $\delta = 9,12 - 6,88$  (m, 24H,  $9 \times CH_{arom}$  FAM,  $8 \times CH_{arom}$  Y,  $2 \times CH_{arom}$  H,  $5 \times CH_{arom}$  W),  $5,16 - 4,68$  (m, 17H,  $1 \times CH_2$  D,  $1 \times CH_2$  H,  $2 \times CH$  V,  $11 \times CH$  Peptid Rückgrat),  $4,59 - 3,67$  (m, 324H,  $162 \times CH_2$  PEO),  $3,31 - 2,80$  (m, 8H,  $4 \times CH_2$  G),  $2,62 - 1,49$  (m, 20H,  $1 \times CH_2$  W,  $1 \times CH_2$  S,  $1 \times CH_2$  Q,  $2 \times CH_2$  Y,  $4 \times CH_2$  K,  $1 \times CH_2$  Q),  $1,14 - 1,06$  (m, 15H,  $4 \times CH_3$  V,  $1 \times CH_3$  A) ppm.

FT-IR:  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3278,45 (s; Amid A; Amid B), 2884,38 (vs;  $CH_2$  (v) PEO; CH (v) Peptid), 1623,96 (s; Amide I), 1517,96 (m; Amid II), 1463,77 (w), 1342,87 (m; OH (Y)), 1279,65 (m; Amid III), 1240,26 (m; OH Phenol), 1100,22 (vs, CO (v) PEO), 958,19 (m;  $RHC=CHR$  (Y) aromatisch), 842,07 (m;  $R_2C=CHR$  (Y) aromatisch).

### 6.6.14 <sup>FAM</sup>TBP1 PEO<sub>120</sub> (<sup>FAM</sup>GGGSGVYKVAYDWQH-PEO<sub>120</sub>)



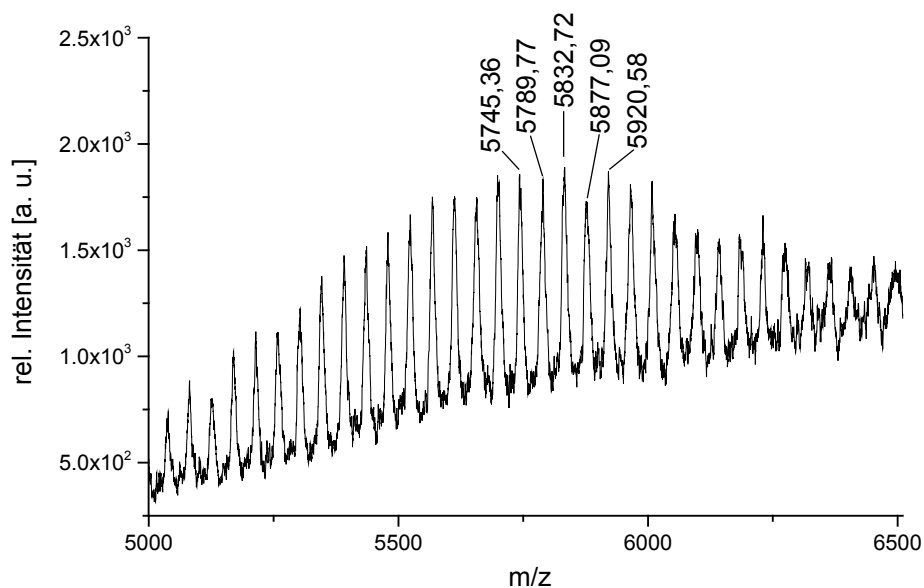
<sup>FAM</sup>TBP1-PEO<sub>120</sub> wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem TentaGel PAP Harz synthetisiert und anschließend mittels Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 5833,06 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{87})+Na]^+$

$\Delta m = 44,0$  (Ethylenoxid Wiederholungseinheiten)

gef.:  $m/z = 5832,72 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{87})+Na]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol zugeordnet werden.

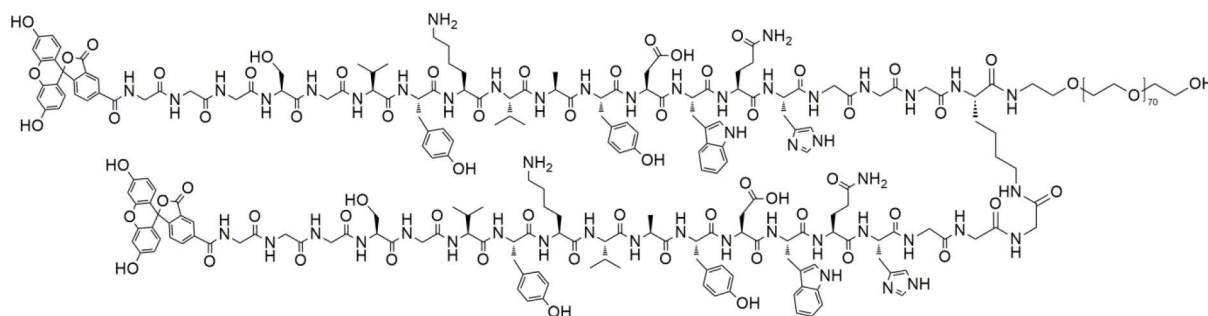


**Abbildung 6.13:** MALDI-TOF-MS Spektrum von <sup>FAM</sup>TBP1-PEO<sub>120</sub> ( $m/z = 5745,36 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{85})+Na]^+$ ,  $5789,77 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{86})+Na]^+$ ,  $5832,72 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{87})+Na]^+$ ,  $5877,09 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{88})+Na]^+$ ,  $5920,58 [M(^{FAM}TBP1-PEO_{89})+Na]^+$ ).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d):  $\delta = 9,11 - 6,89$  (m, 24H,  $9 \times CH_{arom}$  FAM,  $8 \times CH_{arom}$  Y,  $2 \times CH_{arom}$  H,  $5 \times CH_{arom}$  W),  $5,17 - 4,36$  (m, 21H,  $1 \times CH_2$  D,  $1 \times CH_2$  H,  $2 \times CH_2$  Y,  $2 \times CH$  V,  $11 \times CH$  Peptid Rückgrat),  $4,25 - 3,67$  (m, 630H,  $1 \times CH_2$  S,  $314 \times CH_2$  PEO),  $3,58 - 1,47$  (m, 25H,  $1 \times CH_3$  A,  $4 \times CH_2$  G,  $1 \times CH_2$  W,  $1 \times CH_2$  Q,  $4 \times CH_2$  K,  $1 \times CH_2$  Q),  $1,10 - 0,98$  (m, 12H,  $4 \times CH_3$  V) ppm.

FT-IR:  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3279,87 (s; Amid A; Amid B), 2882,78 (vs; CH<sub>2</sub> (v) PEO; CH (v) Peptid), 1627,05 (s; Amide I), 1517,59 (m; Amid II), 1464,35 (m), 1342,90 (m; OH (Y)), 1279,85 (m; Amid III), 1239,73 (m; OH Phenol), 1100,74 (vs, CO (v) PEO), 958,78 (m; RHC=CHR (Y) aromatisch), 840,89 (m; R<sub>2</sub>C=CHR (Y) aromatisch).

#### 6.6.15 <sup>FAM</sup>TBP1<sub>2</sub>-PEO<sub>70</sub> ((<sup>FAM</sup>GGGSGVYKVAYDWQHGGG)<sub>2</sub>K-PEO<sub>70</sub>)



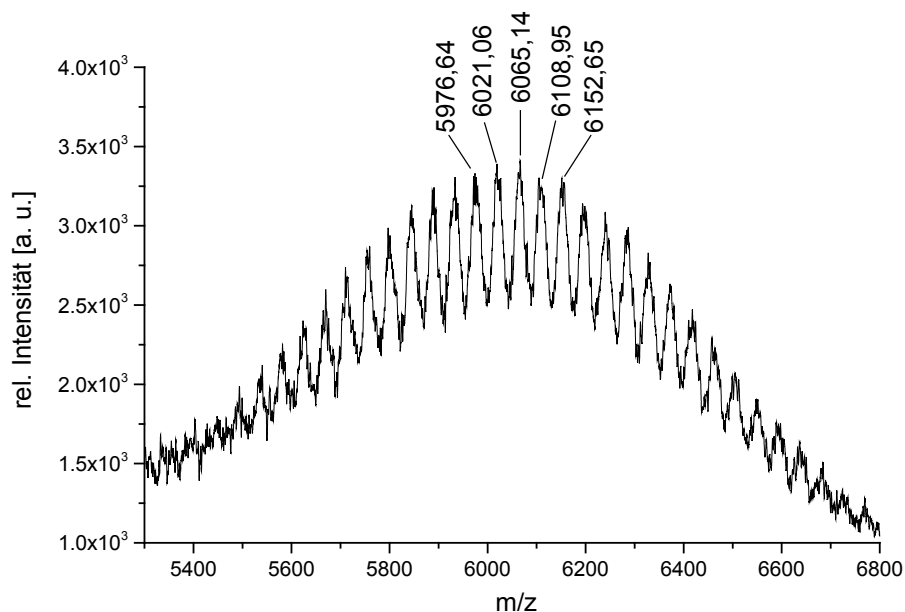
<sup>FAM</sup>TBP1<sub>2</sub>-PEO<sub>70</sub> wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem TentaGel PAP Harz in einem 0,1 mmol Ansatz synthetisiert. Dabei wurden abweichend 0,05 mmol Harz und 20 Äq. der ersten Aminosäure, Fmoc-L-Lys(Fmoc)-OH, eingesetzt. Dadurch entstanden im anschließenden Schritt der Fmoc-Abspaltung zwei Amine, die für die Kupplung mit der nächsten AS zur Verfügung stehen. Das finale Produkt wurde mittels Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 6064,77$  [ $M(^{FAM}TBP1_2-PEO_{37})+Na$ ]<sup>+</sup>

$\Delta m = 44,0$  (Ethylenoxid Wiederholungseinheiten)

gef.:  $m/z = 6065,14$  [ $M(^{FAM}TBP1_2-PEO_{37})+Na$ ]<sup>+</sup>

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol zugeordnet werden.

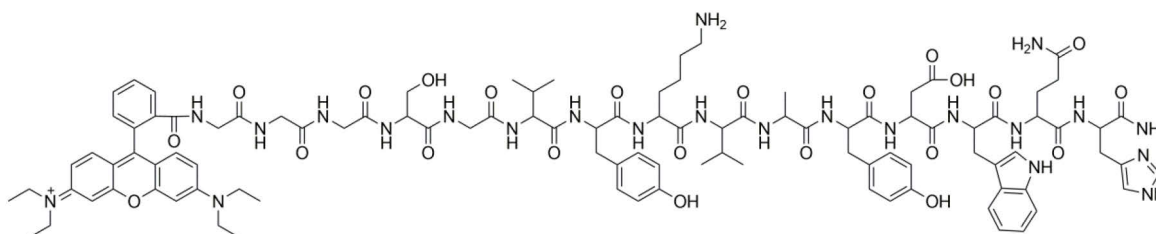


**Abbildung 6.14:** MALDI-TOF-MS Spektrum von  $\text{FAM-TBP1}_2\text{-PEO}_{70}$  ( $m/z = 5976,64$   $[\text{M}(\text{FAM-TBP1}_2\text{-PEO}_{35})+\text{Na}]^+$ ,  $6021,06$   $[\text{M}(\text{FAM-TBP1}_2\text{-PEO}_{36})+\text{Na}]^+$ ,  $6065,14$   $[\text{M}(\text{FAM-TBP1}_2\text{-PEO}_{37})+\text{Na}]^+$ ,  $6108,95$   $[\text{M}(\text{FAM-TBP1}_2\text{-PEO}_{38})+\text{Na}]^+$ ,  $6152,65$   $[\text{M}(\text{FAM-TBP1}_2\text{-PEO}_{39})+\text{Na}]^+$ ).

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA-d):**  $\delta = 9,11 - 6,89$  (m, 48H,  $18 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  FAM,  $16 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  Y,  $4 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  H,  $10 \times \text{CH}_{\text{arom}}$  W),  $5,18 - 4,35$  (m, 43H,  $2 \times \text{CH}_2$  D,  $2 \times \text{CH}_2$  H,  $4 \times \text{CH}_2$  Y,  $4 \times \text{CH}$  V,  $23 \times \text{CH}$  Peptid Rückgrat),  $4,15 - 2,82$  (m, 472H,  $2 \times \text{CH}_2$  W,  $14 \times \text{CH}_2$  G,  $220 \times \text{CH}_2$  PEO),  $2,62 - 1,37$  (m, 42H,  $2 \times \text{CH}_3$  A,  $2 \times \text{CH}_2$  Q,  $12 \times \text{CH}_2$  K,  $2 \times \text{CH}_2$  Q,  $2 \times \text{CH}_2$  S),  $1,12 - 1,03$  (m, 24H,  $8 \times \text{CH}_3$  V) ppm.

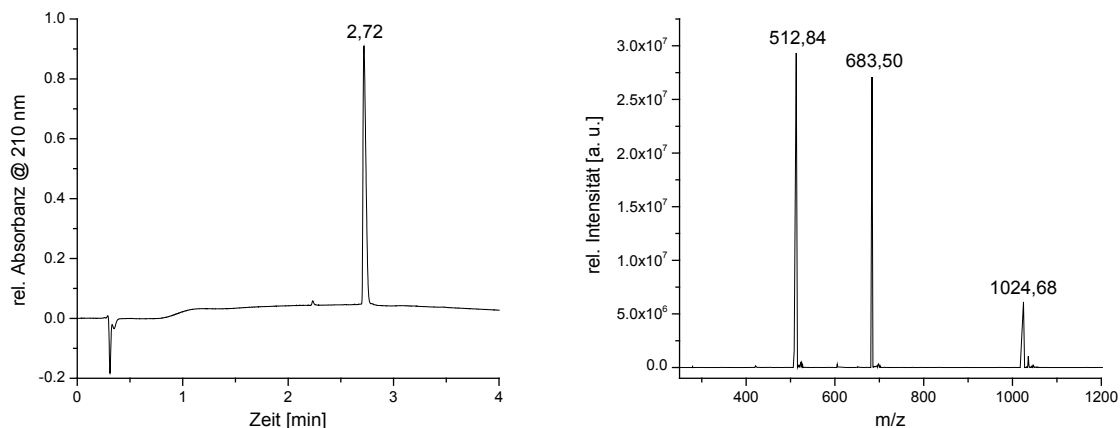
**FT-IR:**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3281,70 (s; Amid A; Amid B), 2875,05 (vs;  $\text{CH}_2$  (v) PEO; CH (v) Peptid), 1625,55 (vs; Amide I), 1517,90 (s; Amid II), 1462,12 (m), 1345,13 (m; OH (Y)), 1280,14 (m; Amid III), 1242,07 (m; OH Phenol), 1201,63 (m), 1100,44 (vs, CO (v) PEO), 955,36 (m;  $\text{RHC}=\text{CHR}$  (Y) aromatisch), 841,91 (m;  $\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$  (Y) aromatisch).

### 6.6.16 $\text{RhoB-TBP1}$ ( $\text{RhoB-GGGSGVYKVAYDWQH}$ )



$\text{RhoB-TBP1}$  wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem Rinkamid Harz synthetisiert und anschließend via HPLC präparativ aufgereinigt.

UPLC & ESI-MS ber.:  $m/z = 512,76 [M+4H]^{4+}, 683,34 [M+3H]^{3+}, 1024,50 [M+2H]^{2+}$   
 gef.:  $m/z = 512,84 [M+4H]^{4+}, 683,50 [M+3H]^{3+}, 1024,68 [M+2H]^{2+}$

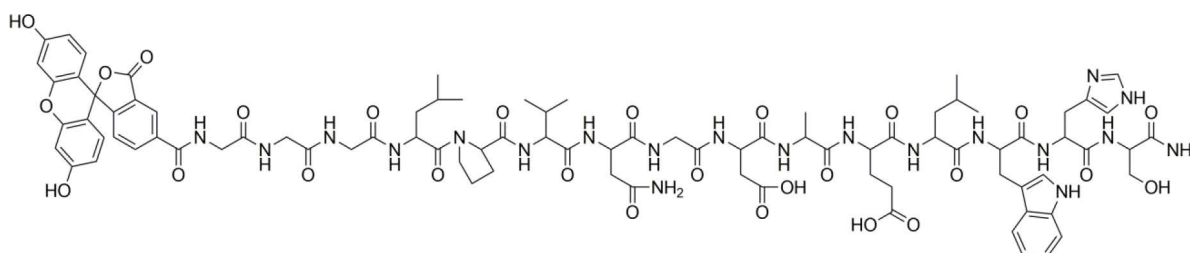


**Abbildung 6.15.** Analyse von  $\text{RhB-TBP1}$ . links: UPLC-Untersuchung unter Verwendung eines Gradienten von 55 - 90 % Acetonitril in Reinstwasser innerhalb von 4 min ( $t_R = 2,72$  min), rechts: ESI-MS Spektrum ( $m/z = 512,84 [M+4H]^{4+}, 683,50 [M+3H]^{3+}, 1024,68 [M+2H]^{2+}$ ).

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 2048,00 [M+H]^+, 2069,98 [M+Na]^+, 2085,95 [M+K]^+$   
 gef.:  $m/z = 2048,12 [M+H]^+, 2070,16 [M+Na]^+, 2086,02 [M+K]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol bestimmt werden.

### 6.6.17 $\text{FAM-TBP2}$ ( $\text{FAM-GGGLPVNGDAELWHS}$ )

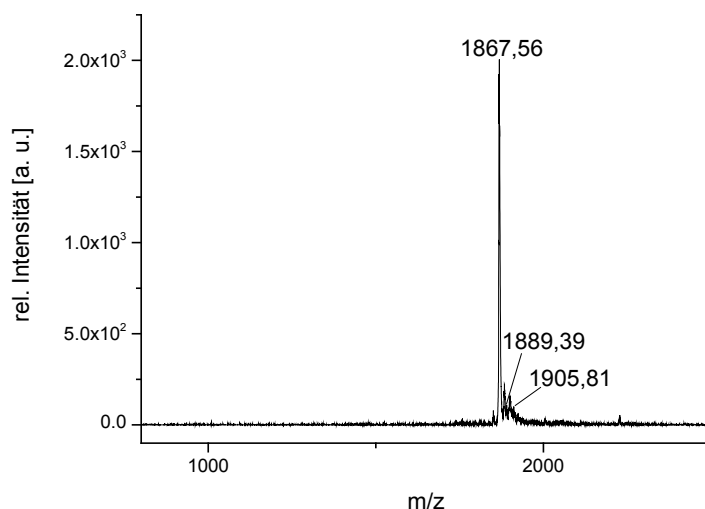


$\text{FAM-TBP2}$  wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem Rinkamid Harz synthetisiert und anschließend durch Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 1866,93 [M+H]^+, 1888,92 [M+Na]^+, 1905,02 [M+K]^+$   
 gef.:  $m/z = 1867,56 [M+H]^+, 1889,39 [M+Na]^+, 1905,81 [M+K]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol bestimmt werden.





**Abbildung 6.16.** MALDI-TOF-MS Spektrum von <sup>FAM</sup>TBP2 ( $m/z = 1867,56 [M+H]^+$ ,  $1889,39 [M+Na]^+$ ,  $1905,81 [M+K]^+$ ).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d):  $\delta = 9,19 - 7,25$  (m, 16H,  $9 \times CH_{arom}$  FAM,  $2 \times CH_{arom}$  H,  $5 \times CH_{arom}$  W),  $5,31 - 5,26$  (m, 2H,  $2 \times CH$  L)  $5,06 - 4,15$  (m, 21H,  $2 \times CH$  V,  $2 \times CH$  L, je  $1 \times CH$  A, S, H, W, E, D, N,  $4 \times CH_2$  G,  $1 \times CH_2$  E),  $3,98 - 3,96$  (m, 3H,  $1 \times CH_2$  N,  $1 \times CH$  P),  $3,22 - 3,14$  (m, 6H,  $1 \times CH_2$  W,  $1 \times CH_2$  N,  $1 \times CH_2$  S),  $2,49 - 2,42$  (m, 2H,  $1 \times CH_2$  H),  $2,34 - 2,19$  (m, 6H,  $2 \times CH_2$  L,  $1 \times CH_2$  E),  $1,85 - 1,74$  (m, 6H,  $3 \times CH_2$  P),  $1,14 - 1,00$  (m, 21H,  $4 \times CH_3$  V,  $2 \times CH_3$  L,  $1 \times CH_3$  A) ppm.

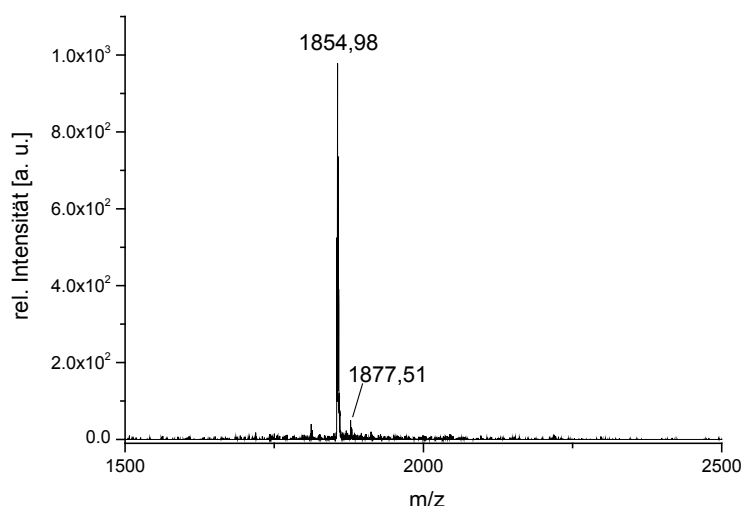
FT-IR:  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) =  $3570,31 - 3015,56$  (s; Amid A; Amid B),  $2958,72$  (m; C-H ( $\nu$ ), Peptid),  $1645,08$  (s; Amid I),  $1531,41$  (m; Amid II),  $1452,96$  (m; O-H ( $\gamma$ )),  $1254,44$  (m; Amid III),  $1190,40$  (m; O-H Phenol),  $1126,36$  (vs, C-O ( $\nu$ )),  $998,27$  (w; RHC=CHR ( $\gamma$ ) aromatisch),  $840,19$  (w;  $R_2C=CHR$  ( $\gamma$ ) aromatisch).

#### 6.6.18 <sup>FAM</sup>TBP3 (<sup>FAM</sup>GGGGLHTSATNLYLH)

<sup>FAM</sup>TBP3 wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem Rinkamid Harz synthetisiert und anschließend durch Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS      ber.:     $m/z = 1854,81 [M+H]^+$ ,  $1876,79 [M+Na]^+$   
                               gef.:     $m/z = 1854,98 [M+H]^+$ ,  $1877,51 [M+Na]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol bestimmt werden.

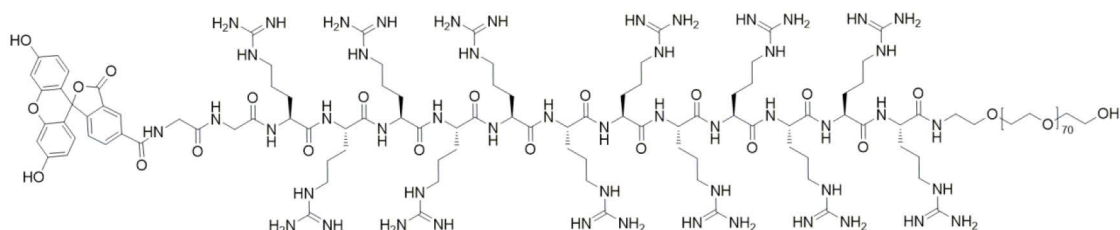


**Abbildung 6.17.** MALDI-TOF-MS Spektrum von <sup>FAM</sup>TBP2 ( $m/z = 1854,98 [M+H]^+$ ,  $1877,51 [M+Na]^+$ ).

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, TFA-d):  $\delta = 9,19 - 6,95$  (m, 17H,  $9 \times CH_{arom}$  FAM,  $4 \times CH_{arom}$  H,  $4 \times CH_{arom}$  Y),  $5,25 - 4,12$  (m, 22H,  $2 \times CH_2$  H,  $1 \times CH_2$  Y,  $2 \times CH$  T,  $3 \times CH$  L,  $11 \times CH$  Peptid Rückgrat),  $3,61 - 3,12$  (m, 8H,  $1 \times CH_2$  S,  $1 \times CH_2$  N,  $2 \times CH_2$  G),  $1,76 - 1,36$  (m, 19H,  $2 \times CH_3$  T,  $1 \times CH_3$  A,  $3 \times CH_2$  L,  $2 \times CH_2$  G),  $1,02 - 0,98$  (m, 18H,  $6 \times CH_3$  L) ppm.

FT-IR:  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3276,07 (s; Amid A; Amid B), 3070,02 (w), 2958,88 (m; C-H (v), Peptid), 1636,41 (vs; Amid I), 1534,56 (s; Amid II), 1462,18 (vw; OH (Y)), 1387,13 (w), 1244,06 (m; Amid III), 1177,01 (w; OH Phenol), 1109,74 (w, CO (v)), 994,50 (vw; RHC=CHR (Y) aromatisch), 830,71 (w;  $R_2C=CHR$  (Y) aromatisch).

#### 6.6.19 <sup>FAM</sup>R<sub>12</sub>-PEO<sub>70</sub> (<sup>FAM</sup>GRRRRRRRRRRRRR-PEO<sub>70</sub>)



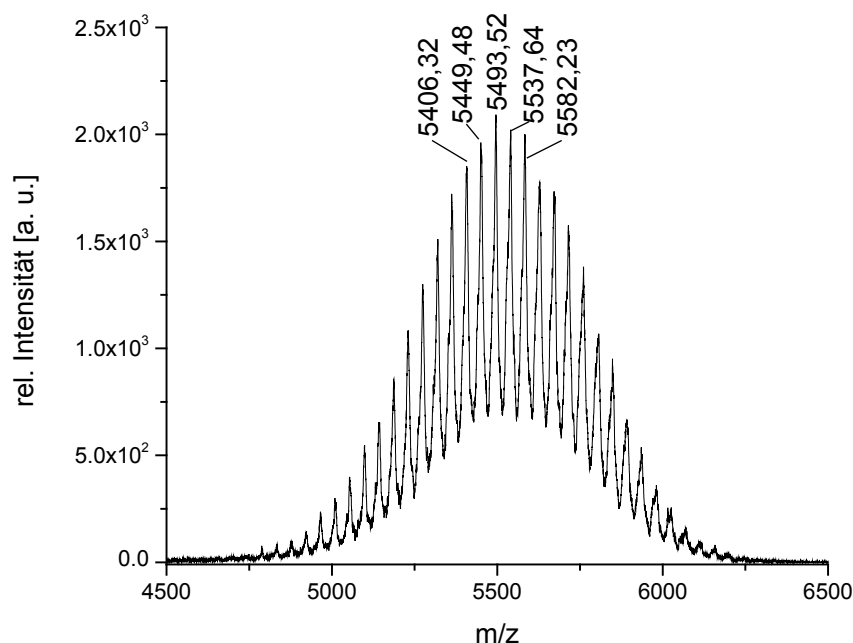
<sup>FAM</sup>R<sub>12</sub>-PEO<sub>70</sub> wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem TenteGel PAP synthetisiert und anschließend durch Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 5492,46 [M(^{FAM}R_{12}-PEO_{71})+H]^+$

$\Delta m = 44,0$  (Ethylenoxid Wiederholungseinheiten)

gef.:  $m/z = 5493,52$   $[M(^{FAM}R_{12}\text{-PEO}_{71})+H]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol zugeordnet werden.

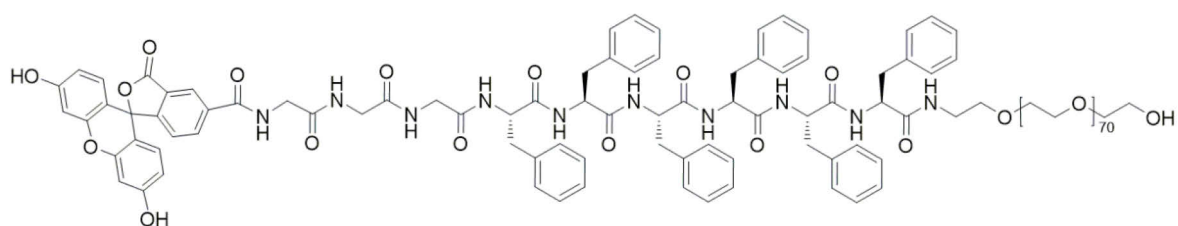


**Abbildung 6.18.** MALDI-TOF-MS Spektrum von  $^{FAM}R_{12}\text{-PEO}_{70}$  ( $m/z = 5406,32$   $[M(^{FAM}R_{12}\text{-PEO}_{69})+H]^+$ ,  $5449,48$   $[M(^{FAM}R_{12}\text{-PEO}_{70})+H]^+$ ,  $5493,52$   $[M(^{FAM}R_{12}\text{-PEO}_{71})+H]^+$ ,  $5537,64$   $[M(^{FAM}R_{12}\text{-PEO}_{72})+H]^+$ ,  $5582,23$   $[M(^{FAM}R_{12}\text{-PEO}_{73})+H]^+$ ).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d$ ):  $\delta = 8,77 - 6,17$  (m, 9H,  $\text{CH}_{\text{arom}}$ , FAM),  $4,80 - 4,83$  (m, 16H,  $2 \times \text{CH}_2$  G,  $12 \times \text{CH}$  Peptid Rückgrat),  $4,42 - 3,87$  (m, 240H,  $120 \times \text{CH}_2$  PEO),  $3,86 - 3,13$  (m, 24H,  $12 \times \text{Y-CH}_2$ , R),  $2,61 - 1,37$  (m, 48H,  $12 \times \beta\text{-CH}_2$  R,  $12 \times \alpha\text{-CH}_2$  R) ppm.

FT-IR:  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) =  $3583,61 - 3011,70$  (s; Amid A; Amid B),  $2863,71$  (s;  $\text{CH}_2$  (v) PEO; CH (v) Peptid),  $1657,19$  (s; Amide I),  $1550,17$  (m; Amid II),  $1344,48$  (m; OH (Y)),  $1279,35$  (m; Amid III),  $1240,02$  (m; OH Phenol),  $1107,27$  (vs, CO (v) PEO),  $956,74$  (m;  $\text{RHC=CHR}$  (Y) aromatisch),  $841,39$  (m;  $\text{R}_2\text{C=CHR}$  (Y) aromatisch).

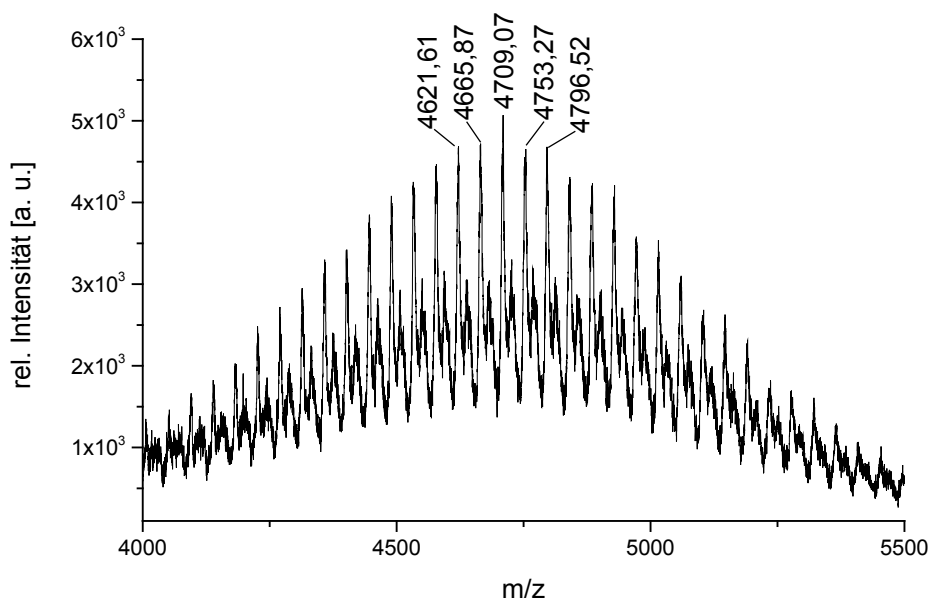
#### 6.6.20 $^{FAM}F_6\text{-PEO}_{70}$ ( $^{FAM}\text{GGGFFFFF-PEO}_{70}$ )



$^{FAM}F_6$ -PEO<sub>70</sub> wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem TentaGel PAP synthetisiert und anschließend durch Dialyse aufgereinigt.

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 4709,45 [M(^{FAM}F_6\text{-PEO}_{74})+Na]^+$   
 $\Delta m = 44,0$  (Ethylenoxid Wiederholungseinheiten)  
 gef.:  $m/z = 4709,07 [M(^{FAM}F_6\text{-PEO}_{74})+Na]^+$

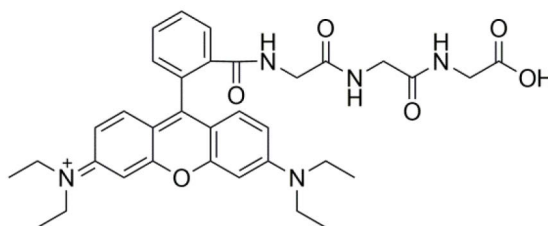
Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol zugeordnet werden.



**Abbildung 6.19.** MALDI-TOF-MS Spektrum von  $^{FAM}R_{12}$ -PEO<sub>70</sub> ( $m/z = 4621,61 [M(^{FAM}F_6\text{-PEO}_{72})+H]^+$ ,  $4665,87 [M(^{FAM}F_6\text{-PEO}_{73})+H]^+$ ,  $4709,07 [M(^{FAM}F_6\text{-PEO}_{74})+H]^+$ ,  $4753,27 [M(^{FAM}F_6\text{-PEO}_{75})+H]^+$ ,  $4796,52 [M(^{FAM}F_6\text{-PEO}_{76})+H]^+$ ).

$^1H$ -NMR (500 MHz, TFA-d):  $\delta = 9,10 - 7,05$  (m, 39H,  $9 \times CH_{arom}$  FAM,  $30 \times CH_{arom}$  F),  $4,89 - 4,59$  (m, 4H,  $4 \times CH$  F),  $4,46 - 4,30$  (m, 2H,  $2 \times CH$  F),  $4,14 - 3,80$  (m, 320H,  $3 \times CH_2$  G,  $157 \times CH_2$  PEO),  $3,66 - 3,50$  (m, 4H,  $2 \times CH_2$  PEO),  $3,18 - 2,98$  (m, 12H,  $6 \times CH_2$  F) ppm.

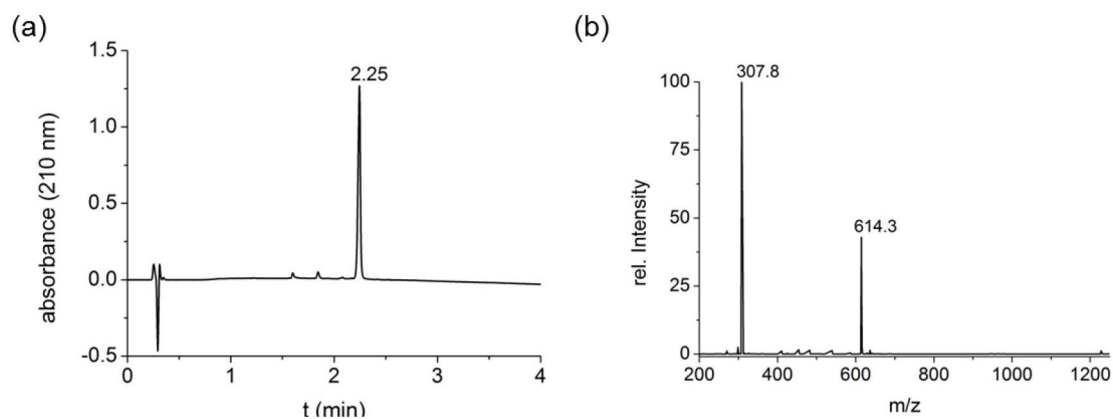
FT-IR:  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3283,04 (s; Amid A; Amid B), 2884,39 (vs;  $CH_2$  (v) PEO; CH (v) Peptid), 1629,53 (s; Amid I), 1521,10 (m; Amid II), 1464,77 (m; Amid II), 1342,97 (m; OH (Y)), 1280,34 (m; Amid III), 1240,02 (m; OH Phenol), 1144,59 (m; OH Phenol), 1098,20 (vs, CO (v) PEO), 958,35 (m;  $RHC=CHR$  (Y) aromatisch), 842,40 (m;  $R_2C=CHR$  (Y) aromatisch).

6.6.21 <sup>RhB</sup>GGG<sup>COOH</sup>

<sup>RhB</sup>GGG<sup>COOH</sup> wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem Chlortritylharz synthetisiert.

UPLC & ESI-MS ber.:  $m/z = 307,9 [M+2H]^{2+}$ ,  $614,7 [M+H]^+$

gef.:  $m/z = 307,8 [M+2H]^{2+}$ ,  $614,3 [M+H]^+$



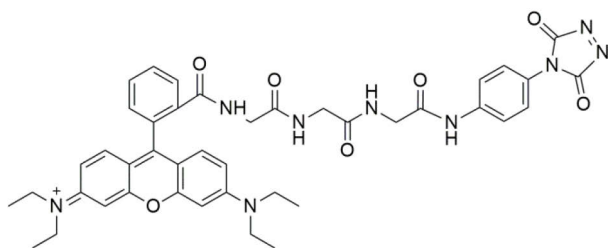
**Abbildung 6.20.** Analyse von <sup>RhB</sup>GGG<sup>COOH</sup>: a) UPLC-Untersuchung unter Verwendung eines Gradienten von 30 - 90 % Acetonitril in Reinstwasser innerhalb von 4 min ( $t_R = 2,25$  min), b) ESI-MS Spektrum ( $m/z = 307,8 [M+2H]^{2+}$ ,  $614,3 [M+H]^+$ ).

MALDI-TOF-MS  $M[\text{calc.}] = 614,7 [M+H]^+$

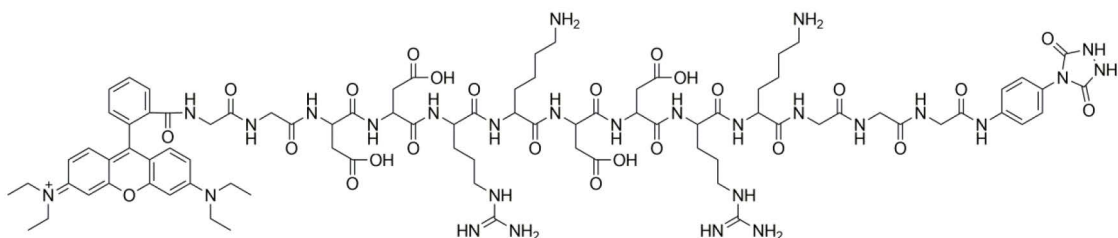
$M[\text{found}] = 615,3 [M+H]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol bestimmt werden.



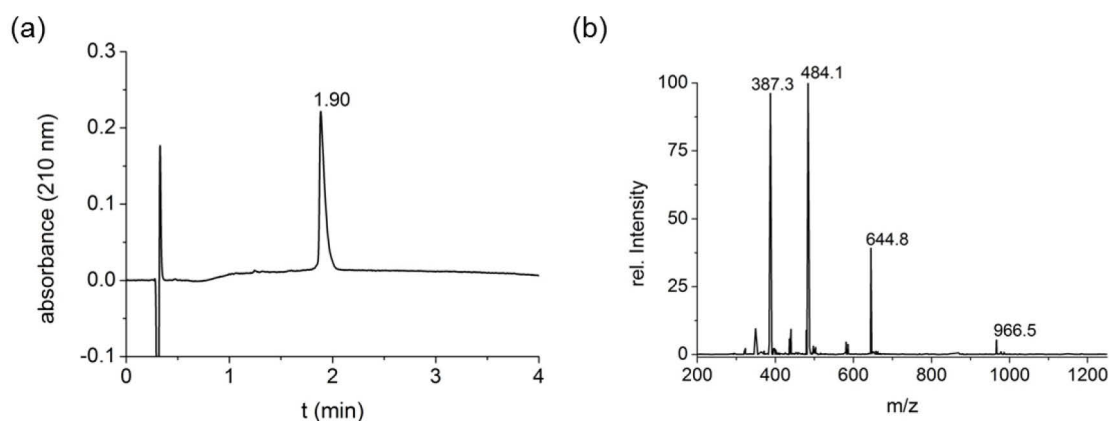
6.6.23 <sup>RhB</sup>GGG-PTAD\*

Zur Aktivierung von <sup>RhB</sup>GGG-PTAD wurde 1 Äq. mit 3 Äq. NBS in DMF unter Argon Atmosphäre für 60 min umgesetzt und dabei langsam von 0 °C auf RT erwärmt. Das aktivierte <sup>RhB</sup>GGG-PTAD\* wurde direkt aus der Lösung ohne weitere Aufreinigung oder Analyse umgesetzt.

6.6.24 <sup>RhB</sup>GG(DDRK)<sub>2</sub>GGG-PTAD

<sup>RhB</sup>GG(DDRK)<sub>2</sub>GGG<sup>COOH</sup> wurde nach den Vorschriften unter Peptidsynthese in Kapitel 6.5 an einem Chlortriethylharz synthetisiert und direkt ohne weitere Aufreinigung und Analyse umgesetzt. 1 Äq. <sup>RhB</sup>GG(DDRK)<sub>2</sub>GGG<sup>COOH</sup> wurde in trockenem DCM gelöst und mit 1,1 Äq. DCC und 1,1 Äq. NHS bei RT über Nacht aktiviert. Nachdem das Lösungsmittel verdampft wurde, wurde das aktivierte Peptid in wenig Pyridin gelöst und 5 Äq. 4-Aminophenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion hinzugegeben. Die Lösung wurde unter Argon Atmosphäre über Nacht gerührt, anschließend wurde das Lösungsmittel erneut verdampft. Das dadurch erhaltene fluoreszente <sup>RhB</sup>GG(DDRK)<sub>2</sub>GGG-PTAD wurde in wenig DMF gelöst und im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

UPLC & ESI-MS      ber.: m/z = 387,4 [M+5H]<sup>5+</sup>, 484,0 [M+4H]<sup>4+</sup>, 645,0 [M+3H]<sup>3+</sup>, 967,0 [M+2H]<sup>2+</sup>  
                               gef.: m/z = 387,3 [M+5H]<sup>5+</sup>, 484,1 [M+4H]<sup>4+</sup>, 644,8 [M+3H]<sup>3+</sup>, 966,5 [M+2H]<sup>2+</sup>



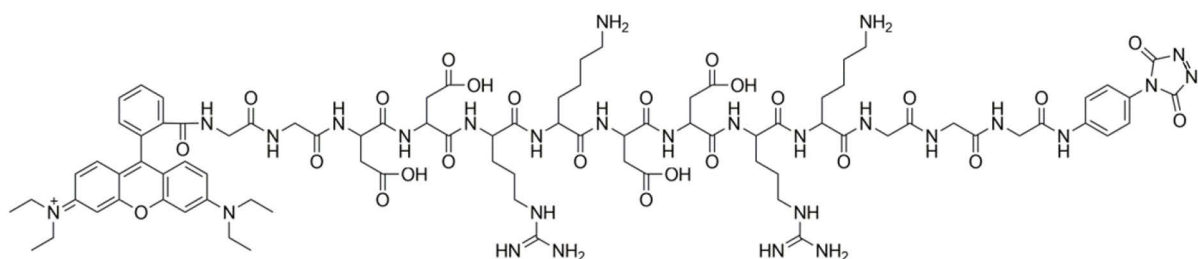
**Abbildung 6.22.** Analyse des stabilen  $\text{RhB-GG(DDRK)}_2\text{GGG-PTAD}$ : a) UPLC-Untersuchung unter Verwendung eines Gradienten von 20 - 60 % Acetonitril in Reinstwasser innerhalb von 4 min ( $t_R = 1,90$  min), b) ESI-MS Spektrum ( $m/z = 387,3$   $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ ,  $484,1$   $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ ,  $644,8$   $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ ,  $966,5$   $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ).

MALDI-TOF-MS ber.:  $m/z = 1932,0$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

gef.:  $m/z = 1931,9$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

Die Signale können mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  g/mol bestimmt werden.

### 6.6.25 $\text{RhB-GG(DDRK)}_2\text{GGG-PTAD}^*$



Zur Aktivierung von  $\text{RhB-GG(DDRK)}_2\text{GGG-PTAD}$  wurde 1 Äq. mit 3 Äq. NBS in DMF unter Argon Atmosphäre für 60 min umgesetzt und dabei langsam von  $0^\circ\text{C}$  auf RT erwärmt. Das aktivierte  $\text{RhB-GG(DDRK)}_2\text{GGG-PTAD}^*$  wurde direkt aus der Lösung ohne weitere Aufreinigung oder Analyse umgesetzt.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] B. Weigl, G. Domingo, P. LaBarre, J. Gerlach, *Lab on a Chip* **2008**, 8, 1999-2014.
- [2] Y. Xiang, Y. Lu, *Nature Chemistry* **2011**, 3, 697-703.
- [3] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, E. Carrilho, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 3-10.
- [4] A. Böhm, F. Carstens, C. Trieb, S. Schabel, M. Biesalski, *Microfluidics and Nanofluidics* **2014**, 16, 789-799.
- [5] P. K. Yuen, V. N. Goral, *Journal of Chemical Education* **2012**, 89, 1288-1292.
- [6] X. Yang, J. Loos, *Macromolecules* **2007**, 40, 1353-1362.
- [7] J. U. Park, M. Hardy, S. J. Kang, K. Barton, K. Adair, D. K. Mukhopadhyay, C. Y. Lee, M. S. Strano, A. G. Alleyne, J. G. Georgiadis, P. M. Ferreira, J. A. Rogers, *Nat Mater* **2007**, 6, 782-789.
- [8] M. J. Ha, Y. Xia, A. A. Green, W. Zhang, M. J. Renn, C. H. Kim, M. C. Hersam, C. D. Frisbie, *ACS Nano* **2010**, 4, 4388-4395.
- [9] J. Li, Y. Zhao, H. S. Tan, Y. L. Guo, C. A. Di, G. Yu, Y. Q. Liu, M. Lin, S. H. Lim, Y. H. Zhou, H. B. Su, B. S. Ong, *Scientific Reports* **2012**, 2, 9.
- [10] S. Logothetidis, *Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials* **2008**, 152, 96-104.
- [11] R. R. Sondergaard, M. Hosel, F. C. Krebs, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **2013**, 51, 16-34.
- [12] Y. X. Gao, H. Y. Li, J. Liu, *PLoS ONE* **2012**, 7, 10.
- [13] Y. X. Gao, H. Y. Li, J. Liu, *PLoS ONE* **2013**, 8, 8.
- [14] G. Jenkins, Y. Wang, Y. L. Xie, Q. Wu, W. Huang, L. H. Wang, X. Yang, *Microfluidics and Nanofluidics* **2015**, 19, 251-261.
- [15] M. Henzler, W. Göpel, *Oberflächenphysik des Festkörpers*, Vieweg+Teubner Verlag, **2013**.
- [16] M. Prutton, *Introduction to Surface Physics*, Clarendon Press, **1994**.
- [17] G. Wu, P. Li, H. Feng, X. Zhang, P. K. Chu, *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, 3, 2024-2042.
- [18] E. Engvall, P. Perlmann, *The Journal of Immunology* **1972**, 109, 129-135.
- [19] H. Zhang, S. Wang, G. Fang, *Journal of Immunological Methods* **2011**, 368, 1-23.
- [20] S. F. Bent, *Surface Science* **2002**, 500, 879-903.
- [21] A. V. Teplyakov, S. F. Bent, *Journal of Vacuum Science & Technology A* **2013**, 31, 050810.
- [22] M.-A. Neouze, U. Schubert, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **2008**, 139, 183-195.
- [23] R. Mout, D. F. Moyano, S. Rana, V. M. Rotello, *Chemical Society Reviews* **2012**, 41, 2539-2544.
- [24] S. Kango, S. Kalia, A. Celli, J. Njuguna, Y. Habibi, R. Kumar, *Progress in Polymer Science* **2013**, 38, 1232-1261.
- [25] S. Ummartyotin, H. Manuspiya, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2015**, 50, 204-213.

- [26] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 4. Auflage ed., Wiley, **2006**.
- [27] T. Fujigaya, N. Nakashima, *Science and Technology of Advanced Materials* **2015**, *16*, 024802.
- [28] A. Di Crescenzo, V. Ettorre, A. Fontana, *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2014**, *5*, 1675-1690.
- [29] P. Tomme, A. Boraston, B. McLean, J. Kormos, A. L. Creagh, K. Sturch, N. R. Gilkes, C. A. Haynes, R. A. J. Warren, D. G. Kilburn, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1998**, *715*, 283-296.
- [30] G. Spur, H. W. Zoch, *Handbuch Wärmebehandeln und Beschichten*, Carl Hanser Verlag GmbH & Company KG, **2015**.
- [31] K. L. Choy, *Progress in Materials Science* **2003**, *48*, 57-170.
- [32] J. Sagiv, *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 92-98.
- [33] A. Ulman, *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 1533-1554.
- [34] F. Schreiber, *Progress in Surface Science* **2000**, *65*, 151-257.
- [35] S. Onclin, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Angewandte Chemie* **2005**, *117*, 6438-6462.
- [36] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 1103-1170.
- [37] B. Zhao, W. J. Brittain, *Progress in Polymer Science* **2000**, *25*, 677-710.
- [38] E. Ruckenstein, Z. F. Li, *Advances in Colloid and Interface Science* **2005**, *113*, 43-63.
- [39] R. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu, H.-A. Klok, *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 5437-5527.
- [40] S. Edmondson, V. L. Osborne, W. T. S. Huck, *Chemical Society Reviews* **2004**, *33*, 14-22.
- [41] Y. Tsujii, K. Ohno, S. Yamamoto, A. Goto, T. Fukuda, in *Surface-Initiated Polymerization I* (Ed.: R. Jordan), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2006**, pp. 1-45.
- [42] A. Olivier, F. Meyer, J.-M. Raquez, P. Damman, P. Dubois, *Progress in Polymer Science* **2012**, *37*, 157-181.
- [43] T. Chen, R. Ferris, J. Zhang, R. Ducker, S. Zauscher, *Progress in Polymer Science* **2010**, *35*, 94-112.
- [44] L. Zhai, *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 7148-7160.
- [45] J. K. Chen, C. J. Chang, *Materials* **2014**, *7*, 805-875.
- [46] S. Shi, R. Pelton, Q. Fu, S. Yang, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2014**, *53*, 4748-4754.
- [47] K. Missoum, M. Belgacem, J. Bras, *Materials* **2013**, *6*, 1745.
- [48] X. Zhou, F. Boey, F. Huo, L. Huang, H. Zhang, *Small* **2011**, *7*, 2273-2289.
- [49] M. Geissler, Y. Xia, *Advanced Materials* **2004**, *16*, 1249-1269.
- [50] G. Delaittre, A. S. Goldmann, J. O. Mueller, C. Barner-Kowollik, *Angewandte Chemie* **2015**, *127*, 11548-11564.
- [51] T. Tischer, T. K. Claus, M. Bruns, V. Trouillet, K. Linkert, C. Rodriguez-Emmenegger, A. S. Goldmann, S. Perrier, H. G. Börner, C. Barner-Kowollik, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 4340-4350.
- [52] I. Barbulovic-Nad, M. Lucente, Y. Sun, M. Zhang, A. R. Wheeler, M. Bussmann, *Critical Reviews in Biotechnology* **2006**, *26*, 237-259.

- [53] S. Chatani, C. J. Kloxin, C. N. Bowman, *Polymer Chemistry* **2014**, 5, 2187-2201.
- [54] M.-M. Russew, S. Hecht, *Advanced Materials* **2010**, 22, 3348-3360.
- [55] P. Yang, W. Yang, *Chemical Reviews* **2013**, 113, 5547-5594.
- [56] B. D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C. G. Willson, G. M. Whitesides, *Chemical Reviews* **2005**, 105, 1171-1196.
- [57] Y. X. and, G. M. Whitesides, *Annual Review of Materials Science* **1998**, 28, 153-184.
- [58] A. Kumar, G. M. Whitesides, *Applied Physics Letters* **1993**, 63, 2002-2004.
- [59] G. M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, D. E. Ingber, *Annual Review of Biomedical Engineering* **2001**, 3, 335-373.
- [60] S. Y. Chou, P. R. Krauss, P. J. Renstrom, *Applied Physics Letters* **1995**, 67, 3114-3116.
- [61] L. J. Guo, *Advanced Materials* **2007**, 19, 495-513.
- [62] D. S. Ginger, H. Zhang, C. A. Mirkin, *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, 43, 30-45.
- [63] R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin, *Science* **1999**, 283, 661-663.
- [64] C. B. Arnold, P. Serra, A. Piqué, *MRS Bulletin* **2007**, 32, 23-31.
- [65] R. Fardel, M. Nagel, F. Nüesch, T. Lippert, A. Wokaun, *Applied Physics Letters* **2007**, 91, 061103.
- [66] G. Colucci, C. Beltrame, M. Giorcelli, A. Veca, C. Badini, *RSC Advances* **2016**, 6, 28522-28531.
- [67] H. Kim, R. C. Y. Auyeung, A. Piqué, *Journal of Power Sources* **2007**, 165, 413-419.
- [68] M. Ollinger, H. Kim, T. Sutto, A. Piqué, *Applied Surface Science* **2006**, 252, 8212-8216.
- [69] G. B. Blanchet, Y.-L. Loo, J. A. Rogers, F. Gao, C. R. Fincher, *Applied Physics Letters* **2003**, 82, 463-465.
- [70] C. Boutopoulos, V. Tsouti, D. Goustouridis, S. Chatzandroulis, I. Zergioti, *Applied Physics Letters* **2008**, 93, 191109.
- [71] A. Ovsianikov, M. Gruene, M. Pflaum, L. Koch, F. Maiorana, M. Wilhelmi, A. Haverich, B. Chichkov, *Biofabrication* **2010**, 2, 014104.
- [72] F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, *Nanomedicine* **2010**, 5, 507-515.
- [73] J. A. Barron, D. B. Krizman, B. R. Ringeisen, *Annals of Biomedical Engineering* **2005**, 33, 121-130.
- [74] J. A. Barron, P. Wu, H. D. Ladouceur, B. R. Ringeisen, *Biomedical Microdevices* **2004**, 6, 139-147.
- [75] J. A. Barron, R. Rosen, J. Jones-Meehan, B. J. Spargo, S. Belkin, B. R. Ringeisen, *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, 20, 246-252.
- [76] E. Tekin, P. J. Smith, U. S. Schubert, *Soft Matter* **2008**, 4, 703.
- [77] R. Tortorich, J.-W. Choi, *Nanomaterials* **2013**, 3, 453-468.
- [78] B. J. de Gans, P. C. Duineveld, U. S. Schubert, *Advanced Materials* **2004**, 16, 203-213.
- [79] Y. Kawahara, S. Hodges, B. S. Cook, C. Zhang, G. D. Abowd, in *Proceedings of the 2013 ACM international joint conference on Pervasive and ubiquitous computing*, ACM, Zurich, Switzerland, **2013**, pp. 363-372.

- [80] Z. H. Nie, E. Kumacheva, *Nat Mater* **2008**, 7, 277-290.
- [81] M. J. J. Coenen, T. M. W. L. Slaats, T. M. Eggenhuisen, P. Groen, *Thin Solid Films* **2015**, 583, 194-200.
- [82] K. Maejima, S. Tomikawa, K. Suzuki, D. Citterio, *RSC Advances* **2013**, 3, 9258-9263.
- [83] W. W. Yu, I. M. White, *Anal Chem* **2010**, 82, 9626-9630.
- [84] J. Jang, J. Ha, J. Cho, *Advanced Materials* **2007**, 19, 1772-1775.
- [85] A. Teichler, J. Perelaer, U. S. Schubert, *J. Mater. Chem. C* **2013**, 1, 1910.
- [86] N. Komuro, S. Takaki, K. Suzuki, D. Citterio, *Anal Bioanal Chem* **2013**, 405, 5785-5805.
- [87] S. Ilkhanizadeh, A. I. Teixeira, O. Hermanson, *Biomaterials* **2007**, 28, 3936-3943.
- [88] T. Xu, W. Zhao, J.-M. Zhu, M. Z. Albanna, J. J. Yoo, A. Atala, *Biomaterials* **2013**, 34, 130-139.
- [89] S. Y. Hwang, G. Lim, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2000**, 5, 159-163.
- [90] C. Lucio do Lago, H. D. Torres da Silva, C. A. Neves, J. G. Alves Brito-Neto, J. A. Fracassi da Silva, *Anal Chem* **2003**, 75, 3853-3858.
- [91] F.-Y. He, A.-L. Liu, J.-H. Yuan, W. K. T. Coltro, E. Carrilho, X.-H. Xia, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, 382, 192-197.
- [92] N. Bao, Q. Zhang, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Journal of Chromatography A* **2005**, 1089, 270-275.
- [93] J. L. Garcia-Cordero, D. Kurzbuch, F. Benito-Lopez, D. Diamond, L. P. Lee, A. J. Ricco, *Lab on a Chip* **2010**, 10, 2680-2687.
- [94] V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Guttler, M. Groning, K. Konig, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, A. Nesterov, I. Block, R. Pipkorn, A. Poustka, F. R. Bischoff, F. Breitling, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, 47, 7132-7135.
- [95] T. Zhang, M. Hu, Y. Liu, Q. Guo, X. Wang, W. Zhang, W. Lau, J. Yang, *Applied Physics Letters* **2016**, 108, 103501.
- [96] U. O. Seker, H. V. Demir, *Molecules* **2011**, 16, 1426-1451.
- [97] A. Care, P. L. Bergquist, A. Sunna, *Trends in Biotechnology* **2015**, 33, 259-268.
- [98] C. Tamerler, M. Sarikaya, *ACS Nano* **2009**, 3, 1606-1615.
- [99] F. Baneyx, D. T. Schwartz, *Current Opinion in Biotechnology* **2007**, 18, 312-317.
- [100] U. Kriplani, B. K. Kay, *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, 16, 470-475.
- [101] U. O. S. Seker, H. V. Demir, *Molecules* **2011**, 16, 1426.
- [102] T. Schwemmer, J. Baumgartner, D. Faivre, H. G. Börner, *J Am Chem Soc* **2012**, 134, 2385-2391.
- [103] K. Shiba, *Current Opinion in Biotechnology* **2010**, 21, 412-425.
- [104] P. Wilke, N. Helfricht, A. Mark, G. Papastavrou, D. Faivre, H. G. Börner, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, 136, 12667-12674.
- [105] P. Wilke, H. G. Börner, *ACS Macro Letters* **2012**, 1, 871-875.
- [106] K. A. Gunay, H. A. Klok, *Bioconjug Chem* **2015**.
- [107] T. Serizawa, H. Matsuno, T. Sawada, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 10252-10260.
- [108] T. Date, J. Sekine, H. Matsuno, T. Serizawa, *Acs Applied Materials & Interfaces* **2011**, 3, 351-359.

- [109] T. Date, K. Tanaka, T. Nagamura, T. Serizawa, *Chemistry of Materials* **2008**, *20*, 4536-4538.
- [110] A. B. Sanghvi, K. P. H. Miller, A. M. Belcher, C. E. Schmidt, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 496-502.
- [111] T. Serizawa, P. Techawanitchai, H. Matsuno, *Chembiochem* **2007**, *8*, 989-993.
- [112] M.-K. Liang, O. Deschaume, S. V. Patwardhan, C. C. Perry, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 80-89.
- [113] C.-Y. Chiu, Y. Li, L. Ruan, X. Ye, C. B. Murray, Y. Huang, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 393-399.
- [114] R. R. Naik, S. J. Stringer, G. Agarwal, S. E. Jones, M. O. Stone, *Nat. Mater.* **2002**, *1*, 169-172.
- [115] C. Tamerler, M. Sarikaya, *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* **2009**, *367*, 1705-1726.
- [116] C. Tamerler, M. Sarikaya, *Acta Biomaterialia* **2007**, *3*, 289-299.
- [117] A. Giuliani, G. Pirri, A. Bozzi, A. Di Giulio, M. Aschi, A. C. Rinaldi, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, *65*, 2450-2460.
- [118] T. Sawada, H. Mihara, T. Serizawa, *Chem Rec* **2013**, *13*, 172-186.
- [119] R. de la Rica, H. Matsui, *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 3499-3509.
- [120] Y. Kumada, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2014**, *1844*, 1960-1969.
- [121] Y. Yang, C. Wang, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2013**, *371*.
- [122] Y. Cui, S. N. Kim, S. E. Jones, L. L. Wissler, R. R. Naik, M. C. McAlpine, *Nano Letters* **2010**, *10*, 4559-4565.
- [123] M. S. Mannoer, H. Tao, J. D. Clayton, A. Sengupta, D. L. Kaplan, R. R. Naik, N. Verma, F. G. Omenetto, M. C. McAlpine, *Nat Commun* **2012**, *3*, 763.
- [124] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385-4415.
- [125] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30-33.
- [126] R. Hassert, A. G. Beck-Sickinger, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2013**, *85*, 69-77.
- [127] Y. Maeda, O. V. Makhlynets, H. Matsui, I. V. Korendovych, *Annual Review of Biomedical Engineering* **2016**, *18*, 311-328.
- [128] J. F. Marcos, A. Muñoz, E. Pérez-Payá, S. Misra, B. López-García, *Annual Review of Phytobiology* **2008**, *46*, 273-301.
- [129] C. Loose, K. Jensen, I. Rigoutsos, G. Stephanopoulos, *Nature* **2006**, *443*, 867-869.
- [130] R. Lévy, N. T. K. Thanh, R. C. Doty, I. Hussain, R. J. Nichols, D. J. Schiffrin, M. Brust, D. G. Fernig, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 10076-10084.
- [131] E. F. Banwell, E. S. Abelardo, D. J. Adams, M. A. Birchall, A. Corrigan, A. M. Donald, M. Kirkland, L. C. Serpell, M. F. Butler, D. N. Woolfson, *Nat Mater* **2009**, *8*, 596-600.
- [132] R. I. Kühnle, H. G. Börner, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 4499-4502.
- [133] J. Eichler, in *Kombinatorische Chemie - Konzepte und Strategien*, 1. Auflage ed., B. G. Teubner GmbH, **2003**.

- [134] M. A. R. Meier, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, 25, 21-33.
- [135] A. G. Beck-Sickinger, P. Weber, **1999**.
- [136] G. P. Smith, *Science* **1985**, 228, 1315-1317.
- [137] S. F. Parmley, G. P. Smith, *Gene* **1988**, 73, 305-318.
- [138] M. Vodnik, U. Zager, B. Strukelj, M. Lunder, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2011**, 16, 790-817.
- [139] J. Pande, M. M. Szewczyk, A. K. Grover, *Biotechnology Advances* **2010**, 28, 849-858.
- [140] A. D. Griffiths, A. R. Duncan, *Current Opinion in Biotechnology* **1998**, 9, 102-108.
- [141] G. P. Smith, V. A. Petrenko, *Chem Rev* **1997**, 97, 391-410.
- [142] J. Rakonjac, N. J. Bennett, J. Spagnuolo, D. Gagic, M. Russel, *Curr Issues Mol Biol* **2011**, 13, 51-76.
- [143] J. W. Kehoe, B. K. Kay, *Chemical Reviews* **2005**, 105, 4056-4072.
- [144] D. J. Rodi, L. Makowski, *Current Opinion in Biotechnology* **1999**, 10, 87-93.
- [145] C. F. Barbas, D. R. Burton, J. K. Scott, G. J. Silverman, **2001**.
- [146] N. E. Biolabs, *Ph.D. Phage Display Libraries 2012, Instruction Manual*.
- [147] J. Scott, G. Smith, *Science* **1990**, 249, 386-390.
- [148] C. E. Z. Chan, A. P. C. Lim, P. A. MacAry, B. J. Hanson, *International Immunology* **2014**, 26, 649-657.
- [149] C.-H. Wu, I.-J. Liu, R.-M. Lu, H.-C. Wu, *Journal of Biomedical Science* **2016**, 23, 1-14.
- [150] M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K. Y. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, *Nat Mater* **2003**, 2, 577-585.
- [151] D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, W. Wagenknecht, in *Comprehensive Cellulose Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2004**, pp. 9-29.
- [152] D. Klemm, B. Heublein, H. P. Fink, A. Bohn, *Angew. Chem., Intern. Ed.* **2005**, 44, 3358-3393.
- [153] A. C. O'Sullivan, *Cellulose* **1997**, 4, 173-207.
- [154] K. J. Edgar, C. M. Buchanan, J. S. Debenham, P. A. Rundquist, B. D. Seiler, M. C. Shelton, D. Tindall, *Progress in Polymer Science* **2001**, 26, 1605-1688.
- [155] C. Wang, R. A. Venditti, K. Zhang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 99, 5791-5799.
- [156] A. K. Bledzki, J. Gassan, *Prog. Polym. Sci.* **1999**, 24, 221-274.
- [157] M. N. Belgacem, A. Gandini, *Composite Interfaces* **2005**, 12, 41-75.
- [158] W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kawecki, R. M. Brown, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 1-12.
- [159] T. Zimmermann, N. Bordeanu, E. Strub, *Carbohydrate Polymers* **2010**, 79, 1086-1093.
- [160] D. Klemm, F. Kramer, S. Moritz, T. Lindstrom, M. Ankerfors, D. Gray, A. Dorris, *Angew. Chem., Intern. Ed.* **2011**, 50, 5438-5466.
- [161] N. Lavoine, I. Desloges, A. Dufresne, J. Bras, *Carbohydrate Polymers* **2012**, 90, 735-764.

- [162] H. P. S. Abdul Khalil, Y. Davoudpour, M. N. Islam, A. Mustapha, K. Sudesh, R. Dungani, M. Jawaid, *Carbohydrate Polymers* **2014**, 99, 649-665.
- [163] S. J. Eichhorn, A. Dufresne, M. Aranguren, N. E. Marcovich, J. R. Capadona, S. J. Rowan, C. Weder, W. Thielemans, M. Roman, S. Renneckar, W. Gindl, S. Veigel, J. Keckes, H. Yano, K. Abe, M. Nogi, A. N. Nakagaito, A. Mangalam, J. Simonsen, A. S. Benight, A. Bismarck, L. A. Berglund, T. Peijs, *Journal of Materials Science* **2009**, 45, 1-33.
- [164] G. Siqueira, J. Bras, A. Dufresne, *Polymers* **2010**, 2, 728.
- [165] H. P. S. Abdul Khalil, A. H. Bhat, A. F. Ireana Yusra, *Carbohydrate Polymers* **2012**, 87, 963-979.
- [166] S. Varanasi, Z.-X. Low, W. Batchelor, *Chemical Engineering Journal* **2015**, 265, 138-146.
- [167] T. Huber, J. Müssig, O. Curnow, S. Pang, S. Bickerton, M. P. Staiger, *Journal of Materials Science* **2012**, 47, 1171-1186.
- [168] A. W. Carpenter, C.-F. de Lannoy, M. R. Wiesner, *Environmental Science & Technology* **2015**, 49, 5277-5287.
- [169] T. Heinze, T. Liebert, *Progress in Polymer Science* **2001**, 26, 1689-1762.
- [170] E. Malmström, A. Carlmark, *Polym. Chem.* **2012**, 3, 1702-1713.
- [171] T. Serizawa, K. Iida, H. Matsuno, K. Kurita, *Chemistry Letters* **2007**, 36, 988-989.
- [172] H. Nakazawa, A. Ikeuchi, D.-M. Kim, Y. Ishigaki, H. Asano, K. Kouda, I. Kumagai, M. Umetsu, *Green Chemistry* **2013**, 15, 365-369.
- [173] N. Khazanov, T. Iline-Vul, E. Noy, G. Goobes, H. Senderowitz, *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, 120, 309-319.
- [174] P. Beguin, *Annual Review of Microbiology* **1990**, 44, 219-248.
- [175] R. E. Nordon, S. J. Craig, F. C. Foong, *Biotechnology Letters* **2009**, 31, 465-476.
- [176] C. Kugge, V. S. J. Craig, J. Daicic, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2004**, 238, 1-11.
- [177] I. Levy, O. Shoseyov, *Biotechnology Advances* **2002**, 20, 191-213.
- [178] M. Linder, T. T. Teeri, *Journal of Biotechnology* **1997**, 57, 15-28.
- [179] C. Oliveira, V. Carvalho, L. Domingues, F. M. Gama, *Biotechnology Advances* **2015**, 33, 358-369.
- [180] S. Yokota, K. Matsuo, T. Kitaoka, H. Wariishi, *BioResources* **2008**, 3.
- [181] I. levy, A. Nussinovitch, E. Shpigel, O. Shoseyov, *Cellulose* **2002**, 9, 91-98.
- [182] Y. Berdichevsky, E. Ben-Zeev, R. Lamed, I. Benhar, *Journal of Immunological Methods* **1999**, 228, 151-162.
- [183] I. Levy, O. Shoseyov, *J Pept Sci* **2001**, 7, 50-57.
- [184] R. Haimovitz, Y. Barak, E. Morag, M. Voronov-Goldman, Y. Shoham, R. Lamed, E. A. Bayer, *PROTEOMICS* **2008**, 8, 968-979.
- [185] R. Azriel-Rosenfeld, M. Valensi, I. Benhar, *Journal of Molecular Biology* **2004**, 335, 177-192.
- [186] R. Pértile, S. Moreira, F. Andrade, L. Domingues, M. Gama, *Biotechnology Progress* **2012**, 28, 526-532.
- [187] F. K. Andrade, S. M. G. Moreira, L. Domingues, F. M. P. Gama, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2010**, 92A, 9-17.

- [188] A. A. Wang, A. Mulchandani, W. Chen, *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, *68*, 1684-1689.
- [189] M. Qi, J. P. O'Brien, J. Yang, *Biopolymers* **2008**, *90*, 28-36.
- [190] J. Guo, J. M. Catchmark, M. N. Mohamed, A. J. Benesi, M. Tien, T. H. Kao, H. D. Watts, J. D. Kubicki, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1795-1805.
- [191] L. A. Brammer, B. Bolduc, J. L. Kass, K. M. Felice, C. J. Noren, M. F. Hall, *Analytical Biochemistry* **2008**, *373*, 88-98.
- [192] Y. Habibi, *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 1519-1542.
- [193] S. Diekmann, G. Siegmund, A. Roecker, D. O. Klemm, *Cellulose* **2003**, *10*, 53-63.
- [194] T. Tischer, A. S. Goldmann, K. Linkert, V. Trouillet, H. G. Börner, C. Barner-Kowollik, *Advanced Functional Materials* **2012**, *22*, 3853-3864.
- [195] K. E. Gregorczyk, D. F. Pickup, M. G. Sanz, I. A. Irakulis, C. Rogero, M. Knez, *Chemistry of Materials* **2015**, *27*, 181-188.
- [196] L. Dall'Acqua, C. Tonin, A. Varesano, M. Canetti, W. Porzio, M. Catellani, *Synthetic Metals* **2006**, *156*, 379-386.
- [197] S. S. Najar, A. Kaynak, R. C. Foitzik, *Synthetic Metals* **2007**, *157*, 1-4.
- [198] P. Bober, J. Liu, K. S. Mikkonen, P. Ihalainen, M. Pesonen, C. Plumed-Ferrer, A. von Wright, T. Lindfors, C. Xu, R.-M. Latonen, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3655-3663.
- [199] M. Tizzotti, A. Charlot, E. Fleury, M. Stenzel, J. Bernard, *Macromolecular Rapid Communications* **2010**, *31*, 1751-1772.
- [200] L. Wojnárovits, C. M. Földvály, E. Takács, *Radiation Physics and Chemistry* **2010**, *79*, 848-862.
- [201] L. Cen, K. G. Neoh, E. T. Kang, *Langmuir* **2003**, *19*, 10295-10303.
- [202] H. Liu, S. W. Gao, J. S. Cai, C. L. He, J. J. Mao, T. X. Zhu, Z. Chen, J. Y. Huang, K. Meng, K. Q. Zhang, S. S. Al-Deyab, Y. K. Lai, *Materials* **2016**, *9*, 124-124.
- [203] B. Balu, V. Breedveld, D. W. Hess, *Langmuir* **2008**, *24*, 4785-4790.
- [204] S. Li, H. Xie, S. Zhang, X. Wang, *Chemical Communications* **2007**, 4857-4859.
- [205] E. Morales-Narváez, H. Golmohammadi, T. Naghdi, H. Yousefi, U. Kostiv, D. Horák, N. Pourreza, A. Merkoçi, *ACS Nano* **2015**, *9*, 7296-7305.
- [206] R. Pelton, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2009**, *28*, 925-942.
- [207] P. Schroll, C. Fehrl, S. Dankesreiter, B. König, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 6510-6514.
- [208] A. Böhm, M. Gattermayer, C. Trieb, S. Schabel, D. Fiedler, F. Miletzky, M. Biesalski, *Cellulose* **2013**, *20*, 467-483.
- [209] T. Tischer, C. Rodriguez-Emmenegger, V. Trouillet, A. Welle, V. Schueler, J. O. Mueller, A. S. Goldmann, E. Brynda, C. Barner-Kowollik, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 4087-4092.
- [210] I. H. Tan, M. L. P. da Silva, N. R. Demarquette, *Journal of Materials Chemistry* **2001**, *11*, 1019-1025.
- [211] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19606-19611.
- [212] X. Li, J. Tian, W. Shen, *Cellulose* **2010**, *17*, 649-659.
- [213] E. Carrilho, S. T. Phillips, S. J. Vella, A. W. Martinez, G. M. Whitesides, *Anal Chem* **2009**, *81*, 5990-5998.



- [214] H. Chen, J. Cogswell, C. Anagnostopoulos, M. Faghri, *Lab on a Chip* **2012**, *12*, 2909-2913.
- [215] E. Carrilho, A. W. Martinez, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7091-7095.
- [216] Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin, B. Lin, *ELECTROPHORESIS* **2009**, *30*, 1497-1500.
- [217] C. Sicard, J. D. Brennan, *MRS Bulletin* **2013**, *38*, 331-334.
- [218] J. Lankelma, Z. Nie, E. Carrilho, G. M. Whitesides, *Anal Chem* **2012**, *84*, 4147-4152.
- [219] R. P. Gandhiraman, D. Nordlund, V. Jayan, M. Meyyappan, J. E. Koehne, *Acs Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6*, 22751-22760.
- [220] S. Kumar, S. Kumar, S. Srivastava, B. K. Yadav, S. H. Lee, J. G. Sharma, D. C. Doval, B. D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *73*, 114-122.
- [221] R. Derda, A. Laromaine, A. Mammoto, S. K. Y. Tang, T. Mammoto, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 18457-18462.
- [222] R. Derda, S. K. Y. Tang, A. Laromaine, B. Mosadegh, E. Hong, M. Mwangi, A. Mammoto, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18940.
- [223] Z. Li, M. Tolba, M. Griffiths, T. G. van de Ven, *Colloids Surf B Biointerfaces* **2010**, *76*, 529-534.
- [224] T. Jabrane, M. Laloi, M. Dubé, P. J. Mangin, *Advances in Printing and Media Technology* **2010**, *37*.
- [225] A. D. Mazzeo, W. B. Kalb, L. Chan, M. G. Killian, J.-F. Bloch, B. A. Mazzeo, G. M. Whitesides, *Advanced Materials* **2012**, *24*, 2850-2856.
- [226] A. Razaq, M. H. Asif, R. Kalsoom, A. F. Khan, M. S. Awan, S. Ishrat, S. M. Ramay, *J. Appl. Pol. Sci.* **2015**, *132*, 5.
- [227] W. Chen, D. Deng, *Carbon* **2015**, *87*, 70-77.
- [228] A. Manekkathodi, M. Y. Lu, C. W. Wang, L. J. Chen, *Advanced Materials* **2010**, *22*, 4059-4063.
- [229] J.-W. Han, B. Kim, J. Li, M. Meyyappan, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 22094-22097.
- [230] J. E. Lee, H. W. Shim, O. S. Kwon, Y.-I. Huh, H. Yoon, *Analyst* **2014**, *139*, 4466-4475.
- [231] A. C. Siegel, S. T. Phillips, M. D. Dickey, N. Lu, Z. Suo, G. M. Whitesides, *Advanced Functional Materials* **2010**, *20*, 28-35.
- [232] J. Hasegawa, N. Yanagida, M. Tamura, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1999**, *153*, 215-220.
- [233] S. Kiatkamjornwong, P. Pomsanam, *Journal of Applied Polymer Science* **2003**, *89*, 238-248.
- [234] J. Yang, T.-J. Wang, H. He, F. Wei, Y. Jin, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2003**, *42*, 5568-5575.
- [235] M. Ataefard, M. R. Saeb, *Journal of Cleaner Production* **2015**, *108*, Part A, 121-130.
- [236] D. Tyagi, Is, *Polyester vs. styrene: Binder choice for toners in digital printing*, Soc Imaging Science & Technology, Springfield, **2006**.
- [237] C. Speyerer, K. Borchers, S. Güttler, G. Tovar, T. Hirth, A. Weber, *Chemie Ingenieur Technik* **2012**, *84*, 322-327.
- [238] C. Speyerer, K. Borchers, J. Storsberg, G. E. M. Tovar, T. Hirth, A. Weber, *MRS Online Proceedings Library Archive* **2013**, *1569*, 165-171.

- [239] Y. Cui, A. Pattabiraman, B. Lisko, S. C. Collins, M. C. McAlpine, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 1204-1205.
- [240] Y. Kumada, Y. Tokunaga, H. Imanaka, K. Imamura, T. Sakiyama, S. Katoh, K. Nakanishi, *Biotechnology Progress* **2006**, *22*, 401-405.
- [241] B. Feng, Y. Dai, L. Wang, N. Tao, S. Huang, H. Zeng, *Biologicals* **2009**, *37*, 48-54.
- [242] N. B. Adey, A. H. Mataragnon, J. E. Rider, J. M. Carter, B. K. Kay, *Gene* **1995**, *156*, 27-31.
- [243] M. Vodnik, B. Štrukelj, M. Lunder, *Analytical Biochemistry* **2012**, *424*, 83-86.
- [244] Y. F. Hu, X. C. Gao, T. Q. Xu, Z. Dun, X. L. Yu, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2016**, *19*, 283-289.
- [245] E. Gruber, in *Steuerung der Benetzbarkeit*, Karlsruhe, **2011**.
- [246] V. Trouillet, S. Heißler, U. Geckle, E. Willin, W. Faubel, in *FZKA 6468 Forschungszentrum Karlsruhe*, **2000**, pp. 30-33.
- [247] M. S. D. S. BROTHER, *TN3200* **2008**.
- [248] A. Endo, M. Ohta, H. Ohira, *Vol. EP 1193565B1*, Brother **2007**.
- [249] P. 't Hoen, S. Jirka, B. Ten Broeke, E. Schultes, B. Aguilera, K. Pang, H. Heemskerk, A. Aartsma-Rus, G. van Ommen, J. den Dunnen, *Analytical Biochemistry* **2012**, *421*, 622-631.
- [250] R. Derda, S. K. Y. Tang, S. C. Li, S. Ng, W. Matochko, M. R. Jafari, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2011**, *16*, 1776-1803.
- [251] M. Lunder, T. Bratkovic, U. Urleb, S. Kreft, B. Strukelj, *BioTechniques* **2008**, *44*, 893-900.
- [252] S. Donatan, H. Yazici, H. Bermek, M. Sarikaya, C. Tamerler, M. Urgen, *Materials Science and Engineering: C* **2009**, *29*, 14-19.
- [253] J.-L. Dewez, A. Doren, Y.-J. Schneider, P. G. Rouxhet, *Biomaterials* **1999**, *20*, 547-559.
- [254] J. Stone-Masui, A. Watillon, *Journal of Colloid and Interface Science* **1975**, *52*, 479-503.
- [255] Z.-M. Wang, J. Wagner, S. Wall, *Aerosol Science and Technology* **2011**, *45*, 1060-1068.
- [256] Y. Z. Chen, J. A. Zheng, H. Li, Z. J. Zhang, *Journal of Polymer Engineering* **2015**, *35*, 199-207.
- [257] M. S. D. S. BROTHER, *TN242C* **2013**.
- [258] M. S. D. S. BROTHER, *TN242M* **2013**.
- [259] M. S. D. S. BROTHER, *TN242Y* **2013**.
- [260] J. H. Wiley, R. H. Atalla, *Carbohydrate Research* **1987**, *160*, 113-129.
- [261] D. A. Fancy, T. Kodadek, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 6020-6024.
- [262] D. H. J. Lopes, S. Sinha, C. Rosensweig, G. Bitan, in *Amyloid Proteins: Methods and Protocols* (Eds.: M. E. Sigurdsson, M. Calero, M. Gasset), Humana Press, Totowa, NJ, **2012**, pp. 11-21.
- [263] M. A. Hubbe, H. Nanko, M. R. McNeal, *BioResources* **2009**, *4*, 850-906.
- [264] U. O. S. Seker, B. Wilson, S. Dincer, I. W. Kim, E. E. Oren, J. S. Evans, C. Tamerler, M. Sarikaya, *Langmuir* **2007**, *23*, 7895-7900.

- [265] M. Hnilova, E. E. Oren, U. O. S. Seker, B. R. Wilson, S. Collino, J. S. Evans, C. Tamerler, M. Sarikaya, *Langmuir* **2008**, 24, 12440-12445.
- [266] C. Tamerler, M. Duman, E. E. Oren, M. Gungormus, X. Xiong, T. Kacar, B. A. Parviz, M. Sarikaya, *Small* **2006**, 2, 1372-1378.
- [267] S. Große, P. Wilke, H. G. Börner, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, 55, 11266-11270.
- [268] H. Ban, J. Gavriluk, C. F. Barbas, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 1523-1525.
- [269] S. Billiet, K. De Bruycker, F. Driessen, H. Goossens, V. Van Speybroeck, J. M. Winne, F. E. Du Prez, *Nat Chem* **2014**, 6, 815-821.
- [270] M. Suzuki, K. Saruwatari, T. Kogure, Y. Yamamoto, T. Nishimura, T. Kato, H. Nagasawa, *Science* **2009**, 325, 1388-1390.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Kraftfeldmikroskop, engl. <i>atomic force microscope</i>
APS	<u>A</u> mmoniumper <u>s</u> ulfat
ATRP	radikalische Polymerisation unter Atomtransfer, engl. <i>atom transfer radical polymerization</i>
ber.	<u>b</u> erechnet
bspw.	<u>b</u> eispiels <u>w</u> eise
bzw.	<u>b</u> eziehungs <u>w</u> eise
CBD	<u>C</u> ellulose- <u>B</u> indungs <u>d</u> omäne
CBP	<u>C</u> ellulose- <u>b</u> indendes <u>P</u> eptid
CP	<u>C</u> itratpuffer
Cp	<u>C</u> yclopentadien(yl)
μCP	Mikrokontaktdruck, engl. <i>micro contact printing</i>
CVD	chemische Gasphasenabscheidung, engl. <i>chemical vapour deposition</i>
DCC	<u>D</u> icyclohexy <u>c</u> arbo <u>d</u> iim <u>d</u>
d. h.	das <u>h</u> eißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Polymerisationsgrad, engl. <i>degree of polymerization</i>
DPN	<u>D</u> ip- <u>P</u> en <u>N</u> anolithographie
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie, engl. <i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>
etc.	und so weiter, lat. <i>et cetera</i>
FAM	Carboxyfluorescein, engl. <i>fluorescent amine marker</i>
gef.	<u>g</u> efunden
LIFT	Laserinduzierter Vorwärtstransfer, engl. <i>laser-induced forward transfer</i>
NBS	<u>N</u> - <u>B</u> roms <u>s</u> uccinimid
NHS	<u>N</u> - <u>H</u> ydroxy <u>s</u> uccinimid
NIL	Nanoprägelithographie, engl. <i>nano imprint lithography</i>
OLED	organische Leuchtdioden, engl. <i>organic light emitting diode</i>
μPADs	mikrofluide papierbasierte analytische Systeme, engl. <i>microfluidic paper analytical devices</i>
PAK	polyzyklischer <u>a</u> romatischer <u>K</u> ohlenwasserstoff
PDMS	<u>P</u> oly( <u>d</u> imethyl <u>s</u> iloxan)

PEO	<u>P</u> oly( <u>e</u> thylen <u>o</u> xid)
PICUP	photo-induzierte Quervernetzung unmodifizierter Proteine, engl. <i>photo-induced cross-linking of unmodified proteins</i>
PS	<u>P</u> oly( <u>s</u> tyrol)
PTAD	4- <u>P</u> henyl-1,2,4- <u>t</u> riazolin-3,5- <u>d</u> ion
REM	<u>R</u> asterelektronen <u>m</u> ikroskop
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
Ru-bpy	<u>R</u> uthenium(II)-tris( <u>b</u> ipyridyl)chlorid
SAM	selbstorganisierende Monoschicht, engl. <i>self-assembled monolayer</i>
SAMIM	Lösungsmittel unterstütztes Mikroformen, engl. <i>solvent assisted micro molding</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SPPS	festphasengebundene Peptidsynthese, engl. <i>solid-phase peptide synthesis</i>
TBP	<u>T</u> oner- <u>b</u> indendes <u>P</u> eptid
TUP	unspezifische Peptid-Bindungssequenz, engl. <i>target unrelated peptide</i>
vgl.	<u>v</u> er <u>g</u> leiche
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel

## **8.2 Lebenslauf**

Name: Steffi Große

### 8.3 Publikationsliste

#### VERÖFFENTLICHUNG

- 2016 Steffi Große, Dr. Patrick Wilke, Prof. Hans G. Börner **Easy Access to Functional Patterns on Cellulose Paper by Combining Laser Printing and Material-Specific Peptide Adsorption**, *Angewandte Chemie International Edition*, **55** (37), 11266-11270 (2016).

#### POSTER

- 2014 Steffi Große, Prof. Hans G. Börner **Surface Functionalization of Printed Patterns via Selective Peptide Adhesion**, 3. *Berliner Chemie Symposium*, Berlin (Deutschland), Posterpreis
- 2014 Steffi Große, Prof. Hans G. Börner **Precision Polymers for Selective Surface Functionalization of Printed Patterns via Peptide Adhesion**, *Europolymer Conference*, Gargnano (Italien)

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

#### **8.4 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, Steffi Große, die vorliegende Arbeit selbstständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



**Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Hans G. Börner für eine sehr interessante und interdisziplinäre Aufgabenstellung bedanken. Die umfangreiche Betreuung, die hilfreichen Diskussionen und der gewährte wissenschaftliche Freiraum während meiner Promotionszeit ermöglichten das Entstehen der vorliegenden Arbeit. Großer Dank geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe Börner, die mir das Arbeiten in freundschaftlicher Atmosphäre mit der nötigen fachlichen Unterstützung ermöglichte. Ich danke Euch nicht nur für eine wunderbare gemeinsame Zeit im Labor, sondern auch für zahlreiche gemeinsame Feierabende. Dabei möchte ich mich speziell bei Katharina Linkert für die Hilfe bei der Synthese zahlreicher Peptide und Konjugate und die stets geduldige Beantwortung all meiner Fragen bedanken. Vielen Dank auch an Dr. Patrick Wilke, Justus Horsch und Dario Remmler für die Messung zahlreicher MALDI-Spektren. Ein großes Dankeschön geht außerdem an Felix Hanßke, Maria Meißler und Sebastian Wieczorek für zahlreiche Diskussionen, die mir durch die Tief- und Höhepunkte meiner Arbeit halfen. Ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle vor allem Dr. Patrick Wilke für eine motivierende und produktive Zusammenarbeit, große Diskussionsbereitschaft, hilfreiche Ideen und das immer mit einem Lächeln im Gesicht. Ein großes Dankeschön geht außerdem an Regina König, die mir bei vielen organisatorischen Problemen zur Seite stand, immer ein offenes Ohr hatte und einfach eine wundervolle Person ist.

Für die schnelle und konstruktive Durchsicht der vorliegenden Arbeit sei an dieser Stelle noch einmal Dr. Patrick Wilke und Felix Hanßke gedankt.

Ich möchte weiterhin Prof. Dr. Christoph Arenz und seinem Arbeitskreis für die Möglichkeit danken, im S1 Labor arbeiten zu können. An dieser Stelle geht besonderer Dank an Marlen Hesse, Susanne Redmer und Stephanie Dietrich für die freundliche Arbeitsatmosphäre im besagten Labor und die Bereitschaft, mir bei zahlreichen Fragen zur Seite zu stehen.

Für die Messung der BET-Oberflächen möchte ich Dr. Franziska Emmerling und Annett Zimathies von der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung danken. Für eine sehr freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit und das Messen zahlreicher bildgebender MALDI Ergebnisse gilt mein großer Dank Dr. Sebastian Beck von der Humboldt-Universität zu Berlin.

Und da das Beste bekanntlich zum Schluss kommt, möchte ich mich natürlich auch bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Ich danke euch für die gelegentlich notwendigen Ablenkungen von der Arbeit, für viel Freude im Leben und die bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen.